

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



Nº. 12-155949-00000-0000

Fecha: 2012-09-11 16:21:24 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 5

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

TITULO: ANTICUERPOS CON UNIÓN DE ANTÍGENOS DEPENDIENTE DEL PH.

SOLICITANTE: RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION y PFIZER INC.

DIRECCIÓN: 230 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080 Y 235 East 42nd Street, New York, New York 10017.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 11 de Septiembre de 2012

P2012/000110

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-155949-00000-0000

Fecha: 2012-09-11 16:21:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

PETITORIO - FORMULARIO PATENTE

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2012/000000

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: **RINAT NEUROSCIENCE
CORPORATION y PFIZER INC.**

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

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **CARLOS R. OLARTE**

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA.

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2011/050989 Fecha Marzo 09, 2011

Publicación Internacional No. WO 2011/111007 A1 Fecha Septiembre 15, 2011

6

Título (54) **ANTICUERPOS CON UNIÓN DE ANTÍGENOS DEPENDIENTE DEL PH.**

Clasificación Internacional (51) A61K 39/00.

Prioridad		(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐		US	Marzo 11, 2010	61/313.102
		US	Febrero 28, 2011	61/447,638

9

Comprobante de pago No. 12- Fecha

10

ANEXOS

☒

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

☒

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

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

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

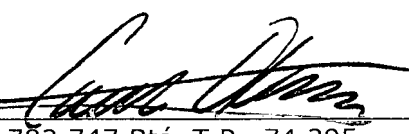
11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2011/050989

Jeffrey Raymond CHABOT

Pfizer Global Research and Development,
200 Cambridge Park Drive, Cambridge,
Massachusetts, 02140,
United States of America
Nacionalidad: Estadounidense

Javier Fernando CHAPARRO RIGGERS

Rinat Neuroscience Corporation,
230 East Grand Avenue,
South San Francisco, California, 94080,
United States of America
Nacionalidad: Alemana

Bruce Charles GOMES

Pfizer Global Research and Development,
200 Cambridge Park Drive, Cambridge,
Massachusetts, 02140,
United States of America
Nacionalidad: Estadounidense

Hong LIANG

Rinat Neuroscience Corporation,
230 East Grand Avenue,
South San Francisco, California, 94080,
United States of America
Nacionalidad: Estadounidense

Kapil MAYAWALA

Pfizer Global Research and Development,
200 Cambridge Park Drive, Cambridge,
Massachusetts, 02140,
United States of America
Nacionalidad: India

Jerome Thomas METTETAL II

Pfizer Global Research and Development,
200 Cambridge Park Drive, Cambridge,
Massachusetts, 02140,
United States of America
Nacionalidad: Estadounidense

Jaume PONS

Rinat Neuroscience Corporation,
230 East Grand Avenue,
South San Francisco, California, 94080,
United States of America
Nacionalidad: Estadounidense

Arvind RAJPAL

Rinat Neuroscience Corporation,
230 East Grand Avenue,
South San Francisco, California, 94080,
United States of America
Nacionalidad: Estadounidense

David Louis SHELTON

Rinat Neuroscience Corporation,
230 East Grand Avenue,
South San Francisco, California, 94080,
United States of America
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0083975

Bogotá D.C., Agosto 15 de 2012 - 16:23:28

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	493223360	15/08/2012	4.250.000.00

*** 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. 12-155949- -00000-0000

Fecha: 2012-09-11 16:21:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

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

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

Agosto 15 de 2012 - 16:23:30



No. 12-155949-00000-0000

Fecha: 2012-09-11 16:21:24 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

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 ☐

TRADUCCIÓN OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE ESTÁ ORIGINALMENTE EN INGLÉS

Nota del traductor:

El documento adjunto de poder de Rinat Neuroscience Corp, 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.

Reconocimiento para todos los propósitos de California

Estado de California

Condado de San Mateo

El día 11 de Septiembre de 2006, ante mí, Beth Calvin, Notario Público, se presentó personalmente Carol Stratford, a quien conozco personalmente como la persona cuyo nombre está suscrito al documento y reconoció ante mí que ejecutó el mismo en su calidad autorizada y que por su firma en el instrumento, la persona o la entidad en cuyo nombre actuó, ejecutó el instrumento.

En constancia firmo y pongo mi sello oficial. (Firmado)

Sello: Beth Calvin, comisión No. 1440211- Notario Público de California, Condado de Santa Clara. Mi comisión vence el 19 de Septiembre de 2007.

Opcional:

Aunque la información siguiente no es exigida por ley, puede ser valiosa para que las personas confíen en el documento y puede evitar que se


Jorge E. Sierra Reyes
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

quite fraudulentamente y que se coloque este formulario a otro documento.

Descripción del documento adjunto:

Documento de Poder.

Fecha del documento: 9/11/06.

Número de páginas: 1.

Firmantes además del ya mencionado: Ninguno.

Apostilla adjunta:

ESTADO DE CALIFORNIA	
SECRETARIO DE ESTADO	
APOSTILLE	
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)	
1. País:	Estados Unidos de América
<u>El presente documento público</u>	
2. Ha sido firmado por:	Beth Calvin
3. Actuando en calidad de:	Notario Público, Estado de California.
4. Lleva el sello/estampilla de:	Beth Calvin, Notario Público, Estado de California
<u>Certificado</u>	
5. En:	Sacramento, California
6. El:	Día 15 de Septiembre de 2006
7. Por:	Subsecretario de Estado, Estado de California.
8. Bajo el No.	304683
9. Sello:	Gran Sello del Estado de California
10. Firma:	Bruce McPherson, Secretario de Estado

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Rinat N. - Poder"

Fecha: 17 de Octubre 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. 8602


Traductor
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

RINAT NEUROSCIENCE CORP.

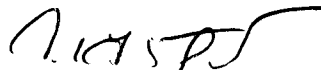
domiciled in

domiciliado en

230 E. Grand Avenue, South San Francisco, California 94080, U.S.A.

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.

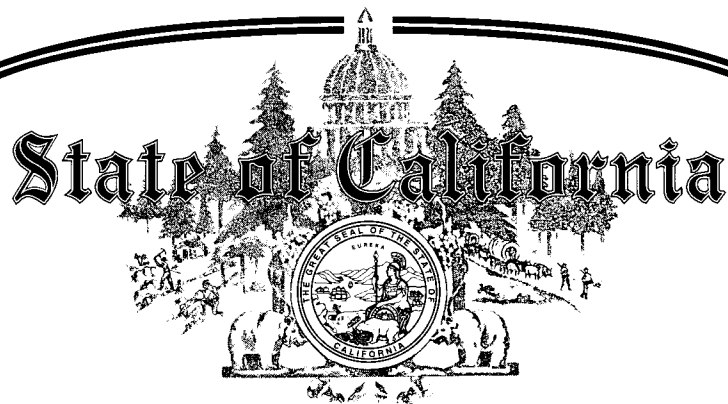
por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, 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: 11 September 2006

City/Country/Ciudad,País: South San Francisco, CA, U.S.A.

So. San Francisco, CA



SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by Beth Calvin*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Beth Calvin, Notary Public,*
State of California

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 15th day of September 2006*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 304683*
9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature*



Bruce M. Brown

Secretary of State



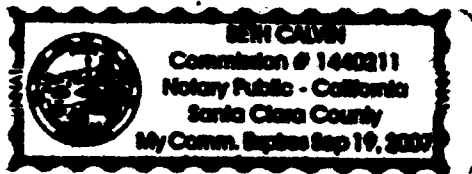
CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of San Mateo } ss.

On 11 September 2006 before me, Beth Calvin, Notary Public,
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")
personally appeared Carol Stratford,
Name(s) of Signer(s)

☒ personally known to me
☐ 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.

WITNESS my hand and official seal.

[Signature]
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: Power of Attorney

Document Date: 9/11/06 Number of Pages: 1

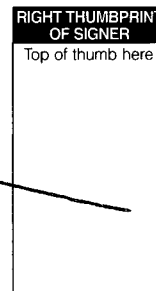
Signer(s) Other Than Named Above: none

Capacity(ies) Claimed by Signer

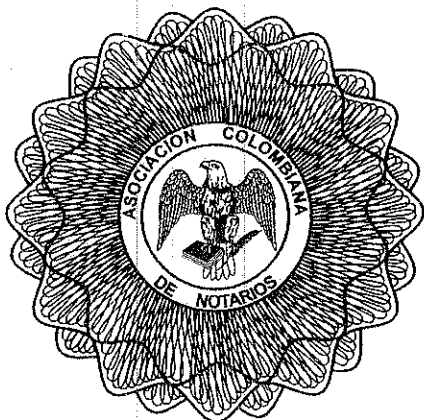
Signer's Name: _____

- ☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____



WK 4682687



ESCRITURA PUBLICA NUMERO -----
TRESCIENTOS VEINTIUNO (321).-----

En la ciudad de Bogotá, Distrito
Capital, República de Colombia, a los
Veintitres - - - (23) días del mes de
Marzo - - - - - del año dos mil siete
(2007), ante mi, MARIA EUGENIA ROJAS DE

Se Dio
3 Copias
29 MAR. 2007

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

CLASE(S) DE ACTO: PROTOCOLIZACION: -----
CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA -----
C.C. No. 79.782.747.-----

Compareció CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA mayor de
edad, vecino de ésta ciudad, identificado con la cédula de
ciudadanía número 79.782.747, obrando en su propio nombre y
dijo: -----

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

PODER GENERAL.-----

El suscrito, PFIZER INC, domiciliado en 235 East 42nd Street,
New York, New York 10017, USA, nombramos por el presente
otorga a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con oficinas en el World
Trade Center- Torre A, Calle 100 No. 8ª-37, piso 10, Bogotá D.C.
nuestros representantes legales con facultades para recibir
notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales
en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para

NOTARIA VEINTISIETE
Maria Eugenia Rojas de Uruea

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado a intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la Ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento, y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses.-----

Firma (ilegible) Gregg C. Benson, Assistant General Counsel -----

Fecha: 20 February 2007.-----

Ciudad, Groton, Connecticut 06340 USA.-----

CERTIFICACION NOTARIAL -----

En esta fecha, -----

el Notario Público suscrito certifica: -----

Que GREGG C. BENSON mayor y domiciliado PFIZER INC.,
EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 USA

NOTARIO PUBLICO
(HAY SELLO ADHERIDO)

APOSTILLE

(Convención de la Haya, Octubre 5, 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. PAIS: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
2. HA SIDO FIRMADO POR **STEPHEN DAVID FINN**
3. ACTUANDO EN SU CALIDAD DE **NOTARIO PUBLIC**
4. LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE DICHO NOTARIO PUBLICO

CERTIFICADO

5. EN **LONDRES**
6. EL DIA **FEBRERO 27, 2007**
7. POR EL SECRETARIO PRINCIPAL DE ESTADO DE SU MAJESTAD PARA ASUNTOS EXTERIORES Y DE LA COMUNIDAD.
8. NR. **H303068**
9. SELLO/ESTAMPILLA
10. FIRMADO

O. WILLIAM
(HAY FIRMA)

Si este documento va a ser usado en un país no miembro de la Convención de La Haya de Octubre 5, 1961, debe ser presentado ante la sección consular de la misión representante de ese país. Una apostilla o certificado de legalización solamente confirma que la firma, sello o estampilla en el documento es auténtica. No significa que el contenido del documento sea correcto o que la Oficina de Extranjería de la Comunidad apruebe el contenido.

CERTIFICADO DE AUTENTICIDAD: El suscrito Traductor e Interprete Oficial juramentado, y debidamente registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, con el presente certifica que esta es una traducción auténtica, verdadera, y precisa al Idioma Castellano, del documento en Inglés, **anexo**.

FIDEL ANTONIO MURCIA MURCIA

Traductor e Interprete Oficial
Resolución No. 488/94 Ministerio de Justicia

Fidel Murcia



NOTARIA VENTISIETE
María Eugenia Rojas de Urrieta

BOGOTA DC. MARZO 12, 2007

TRADUCCIÓN OFICIAL LEGALIZACIONES EN PODER
(VERIFIQUE ANTES DE PROCEDER)

NOTA DE TRADUCCIÓN: SE TRATA DE UN PODER CONFERIDO POR **PFIZER INC** A **OLARTE RAISBECK & FRIERI LTD**, DE FECHA **FEB-20-2007**, SUSCRITO EN GROTON, CONNECTICUT, USA, EN IDIOMA CASTELLANO E INGLES, CON CERTIFICACIÓN NOTARIAL TAMBIEN EN INGLES Y CASTELLANO; Y CERTIFICACIÓN NOTARIAL Y APOSTILLE IN IDIOMA INGLES, CUYA TRADUCCIÓN ES LA SIGUIENTE:

SE INFORMA QUE YO, STEPHEN DAVID FINN DE 31 AMERSHAM HILL DRIVE HIGH WYCOMBE BUCKINGHAMSHIRE, REINO UNIDO, NOTARIO DEBIDAMENTE AUTORIZADO,

CERTIFICO SOLAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXO AL PRESENTE TITULADO,

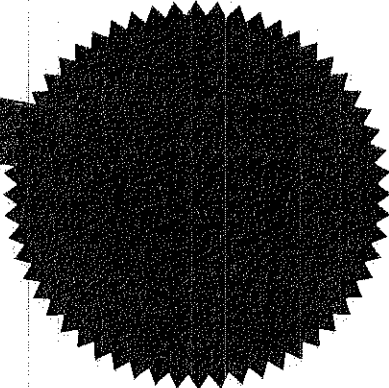
PODER, firmado por Gregg C Benson

En este día ha sido presentado a mi por Servicios Consulares Blair en nombre de su cliente Pfizer, y que dichos Servicios Consulares Blair han manifestado ante mi mediante tal presentación que su mencionado cliente ha manifestado ante ellos que el documento anexo es un documento original auténtico.

FIRMADO, y sellado en 31 Amersham Hill Drive antes mencionado, el 23 de Febrero 2007.

(HAY FIRMA)
STEPHEN FINN





BE IT KNOWN that I, STEPHEN DAVID FINN of 31 Amersham Hill Drive
High Wycombe Buckinghamshire United Kingdom a duly authorised Notary
Public

CERTIFY only that the document annexed hereto, namely:

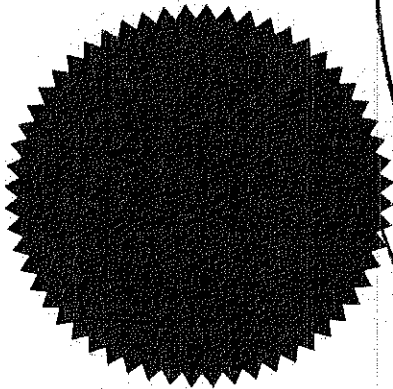
GENERAL POWER signed by Gregg C. Benson.

has this day been presented to me by Blair Consular Services on behalf of
their client Pfizer, and that the said Blair Consular Services have represented
to me by such presentation that their said client has represented to them that
the annexed document is an authentic original document.

SIGNED and sealed at 31 Amersham Hill Drive aforesaid on 23rd February
2007.



Stephen Finn
Notary Public



NOTARIA VENTISIETE

Maria Eugenia Rojas de Irujo

OLA

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **Stephen David Finn**
a été signé par

3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de

4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres
6. the/le **27 February 2007**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **H303068**

9. Stamp:
timbre:
10. Signature: **O Williams**



(Handwritten signature of O Williams)

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

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

General Power

The undersigned,

domiciled in

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

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

Signature/Firma:

Gregg C. Benson, Assistant General Counsel

Date/Fecha:

20 February 2007

City/Country:

Groton, Connecticut 06340 USA

Poder General

El suscrito,

domiciliado en

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

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

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

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

NOTARIA VENTISIEVE
María Eugenia Rojas de Uribe

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

On this date,
20 February 2007

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

GREGG C. BENSON
PFIZER INC., EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 USA
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as ASSISTANT GENERAL COUNSEL OF PFIZER INC.

3. That Pfizer Inc. having its principal place of business located in 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

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):

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

mayor de edad y domiciliado

GREGG C. BENSON
suscribió el documento que antecede.

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

4. Que

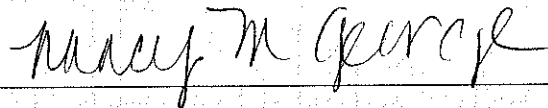
con sede principal ubicada en

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

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

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

NOTARY PUBLIC (Signature):



NANCY M. GEORGE

Notary Public

My Commission Expires 30 June 2011



suscribió el documento que antecede. ---
 2- Que el otorgante ha suscrito el
 referido documento en su carácter de ----
 4. Que con sede principal ubicada en.-----
 está legalmente constituida, que tiene
 existencia legal vigente y que los
 propósitos para los cuales se otorga el

poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.
 4.- Que el otorgante tiene la representación para suscribir el
 poder, y que ésta es legítima.- -----
 5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos
 2, 3, y 4 fue la exhibición de (los) (del) siguiente(s) documento(s)
 auténtico(s): NANCY M. GEORGE Notary Public My commission
 Expires 30 June 2001.- -----

BOGOTA, MARZO 12, 2007- -----

TRADUCCION OFICIAL LEGALIZACIONES EN PODER -----

NOTA DE TRADUCCION: SE TRATA DE UN PODER
 CONFERIDO POR PFIZER INC A OLARTE RAISBECK & FRIER
 LTD DE FECHA FEB-20-2007, SUSCRITO EN GROTON
 CONNECTICUT, USA, EN IDIOMA CASTELLANO E INGLES,
 CON CERTIFICACION NOTARIAL TAMBIEN EN INGLES Y
 CASTELLANO; Y CERTIFICACION NOTARIAL Y APOSTILLE IN
 IDIOMA INGLES, CUYA TRADUCCIÓN ES LA SIGUIENTE: -----

SE INFORMA QUE YO, STEPHEN DAVID FINN DE 31
 AMERSHAM HILL DRIVE HIGH WYCOMBE
 BUCKINGHAMSHIRE, REINO UNIDO NOTARIO DEBIDAMENTE
 AUTORIZADO -----

CERTIFICO SOLAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXO AL
 PRESENTE TITUADO, -----

PODER, firmado por Gregg C Benson -----

En este día ha sido presentado a mi por Servicios Consulares Blair
 en nombre de su cliente Pfizer, y que dichos Servicios Consulares

NOTARIA VEINTISIETE

Maria Eugenia Rojas de Uribe



Blair han manifestado ante mi mediante tal presentación que su mencionado cliente ha manifestado ante ellos que el documento anexo es un documento original auténtico.-----

FIRMADO, y sellado en 31 Amersham Hill Drive antes mencionado, el 23 de Febrero 2007.-----

(HAY FIRMA) STEPHEN FINN NOTARIO PUBLICO (HAY SELLO ADHERIDO).-----

APOSTILLE

(Convención de la Haya, Octubre 5, 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte -----

ESTE DOCUMENTO PUBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: STEPHEN DAVID FINN-----

3. ACTUANDO EN CALIDAD DE NOTARIO PUBLIC-----

4 LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE DICHO NOTARIO PUBLICO -----

CERTIFICADO

5. EN LONDRES-----

6) EL DÍA FEBRERO 27, 2007 -----

7. POR EL SECRETARIO PRINCIPAL DE ESTADO DE SU MAJESTAD PARA ASUNTOS EXTERIORES Y LA COMUNIDAD.-

8 NR.H303068 -----

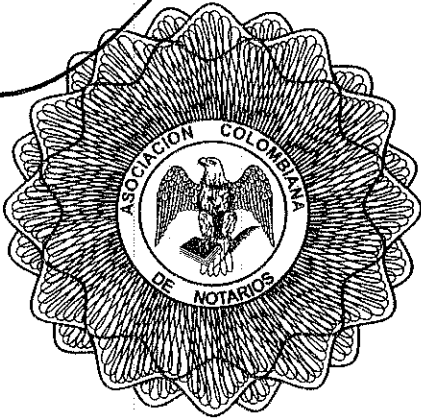
9. SELLO/ ESTAMPILLA: == -----

10. Firmado O. WILLIAM (HAY FIRMA)-----

CERTIFICADO DE AUTENTICIDAD: El suscrito Traductor e Interprete Oficial juramentado, y debidamente registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, con el presente certifica que esta es una traducción auténtica, verdadera, y precisa al Idioma Castellano, del documento en Inglés, anexo.-----

FIDEL ANTONIO MURCIA MURCIA Traductor e Interprete Oficial Resolución No. 488/94 Ministerio de Justicia (fdo. Fidel Murcia)".-----

WK 4682690



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

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

NOTARIA VEINTISIETE
María Eugenia Rojas de Uribe

ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION.- Leído el presente instrumento por el (los) compareciente (s) y advertido (s) sobre las formalidades legales, lo aprueban y firman conmigo y ante mí la(el) Notaria(o) quién lo autoriza. A los otorgantes se les advirtió finalmente que una vez firmado el presente instrumento, La(el) Notaria(o) no aceptará correcciones o modificaciones sino en la forma y casos previstos por la Ley. -- Se utilizaron las hojas de papel Notarial Nos:

WK 4682687, WK 4682689, WK 4682690.-----

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

DERECHOS LEGALES: \$ 38.110.00

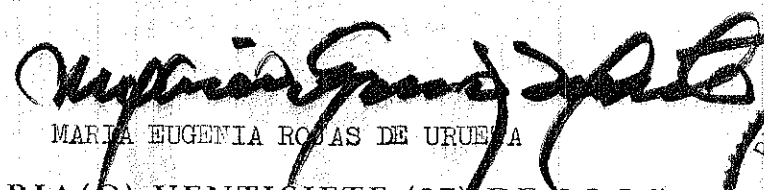
RESOLUCION 7880 DE 2006

IVA \$ 12.078.00


CARLOS REINALDO OJARTE GARCIA

C.C.No. 79'782.747 BIA

TEL: 601-7700


MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA

NOTARIA(O) VENTISIETE (27) DE BOGOTA



redb.

Es fiel y Sexta 169
fotocopia de la Escritura Pública No. 321
de fecha 23 de Marzo de 2007
tomada de su original que expido en
Seis (6) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 22 MAYO 2007

El Notario Veintisiete de Santafé de Bogotá.



(43) International Publication Date
15 September 2011 (15.09.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/111007 A2(51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/IB2011/050989(22) International Filing Date:
9 March 2011 (09.03.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/313,102 11 March 2010 (11.03.2010) US
61/447,638 28 February 2011 (28.02.2011) US(71) Applicants (for all designated States except US): **RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION** [US/US]; 230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080 (US). **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).

(72) Inventors; and

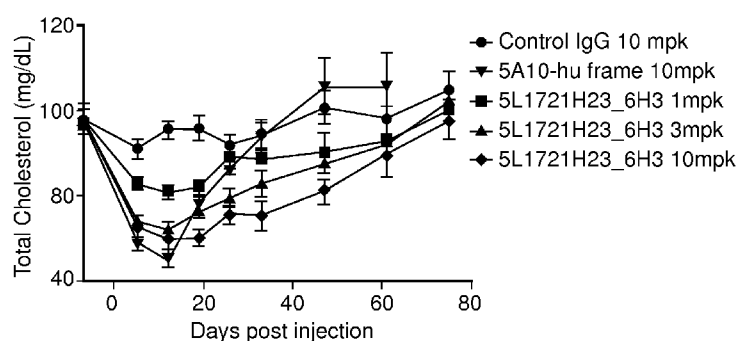
(75) Inventors/Applicants (for US only): **PONS, Jaume** [US/US]; Rinat Neuroscience Corporation 230 East, Grand Avenue, South San Francisco, California 94080 (US). **CHABOT, Jeffrey, Raymond** [US/US]; Pfizer Global Research & Development, 200 Cambridge Park Drive, Cambridge, Massachusetts 02140 (US). **CHAPARRO RIGGERS, Javier, Fernando** [DE/US]; Rinat Neuroscience Corporation 230 East, Grand Avenue, South SanFrancisco, California 94080 (US). **GOMES, Bruce, Charles** [US/US]; Pfizer Global Research & Development, 200 Cambridge Park Drive, Cambridge, Massachusetts 02140 (US). **LIANG, Hong** [US/US]; Rinat Neuroscience Corporation 230 East, Grand Avenue, South San Francisco, California 94080 (US). **MAYAWALA, Kapil** [IN/US]; Pfizer Global Research & Development, 200 Cambridge Park Drive, Cambridge, Massachusetts 02140 (US). **METTETAL II, Jerome, Thomas** [US/US]; Pfizer Global Research & Development, 200 Cambridge Park Drive, Cambridge, Massachusetts 02140 (US). **RAJPAL, Arvind** [US/US]; Rinat Neuroscience Corporation 230 East, Grand Avenue, South San Francisco, California 94080 (US). **SHELTON, David, Louis** [US/US]; Rinat Neuroscience Corporation 230 East, Grand Avenue, South San Francisco, California 94080 (US).(74) Agent: **KLEIMAN, Gabriel, L.**; Pfizer Inc. 235 East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).

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

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODIES WITH pH DEPENDENT ANTIGEN BINDING

FIGURE 7B



(57) Abstract: The present invention relates to antibodies with pH dependent binding to its antigen such that the affinity for antigen binding at physiological pH (i.e., pH 7.4) is greater than at endosomal pH (i.e., pH 6.0 or 5.5). In other words, the K_D or k_{off} ratio at pH 5.5/ pH 7.4 or at pH 6.0/ pH 7.4 is more than, or ranges between, 2, 3, 4, 8, 10, 16, 20, 30, 40, or 100 or more. Such pH dependent antibodies preferentially dissociate from the antigen in the endosome. This can increase antibody half life, as compared to antibodies with equivalent K_D s at pH 7.4 but with no pH dependent binding, when the antigen is one that undergoes antigen-mediated clearance (e.g., PCSK9). Antibodies with pH dependent binding can decrease total antigen half life when the antigen undergoes reduced clearance when bound to antibody (e.g., IL6). Antibodies with pH dependent binding can also prolong the decrease in antigen which is not antibody-bound. This can be important when antagonizing a target antigen typically present at high levels (e.g., IgE, DKK1, C5 and SOST). In addition, such antibodies can increase antigen half life when the antigen is a receptor and the receptor has increased clearance when bound to antibody (e.g., GMCSF receptor).



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 the identity of the inventor (Rule 4.17(i))
- 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:

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

- 1 -

Antibodies with pH Dependent Antigen Binding

Field of the Invention

The present invention relates to antibodies, e.g., full length antibodies or antigen-binding portions thereof, that have pH dependent binding such that the K_D and/or k_{off} ratio at endosomal pH/ physiologic pH (e.g., pH 5.5/ pH 7.4 or pH 6.0/ pH 7.4) is 2 or greater.

Background of the Invention

Monoclonal antibodies (mAbs) have become important therapeutic options for numerous diseases (Brekke and Sandlie, Nat Rev Drug Discov 2: 52-62, 2003; Maggon, Curr Med Chem 14: 1978-1987, 2007). Most of the mAbs now on the market are IgG antibodies. Their relatively long half-life is mediated by FcRn binding. IgG uptake into the cell occurs via fluid phase pinocytosis, and the IgG subsequently binds to FcRn in the acidified environment (pH 6.0) of the endosomal compartment (Lobo et al., J Pharm Sci 93: 2645-2668, 2004). FcRn-bound IgG is thought to be protected from degradation by recycling to the cell surface where the neutral pH facilitates dissociation and release of the IgG into circulation. Unbound IgG, by contrast, is believed to be transferred to lysosomes and subsequently degraded (Lencer and Blumberg, Trends Cell Biol 15: 15: 5-9, 2005).

Recently, various technologies for optimizing the functional activity of an IgG antibody by introducing specific substitutions have been applied in order to reduce dose and/or dose frequency and improve efficacy and safety (Presta, Curr. Opin Immunol 20: 460-470, 2008). Generally, optimization of IgG antibodies can be classified into engineering the Fc constant region, to impact antibody binding to FcRn, FcγR and the complement system, and engineering the variable region to impact binding affinity.

Several works describe engineering the constant region to increase binding to Fc γ-receptors and thus enhance the effector function of an IgG1 antibody (Stavenhagen et al., Cancer Res 67: 8882-8890, 2007; Zalevsky et al., Blood 113: 3735-3743, 2009). Substitutions such as S239D/I332E/A330L or F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L into IgG1 have been shown to improve Fc γ-receptor IIIa binding and exhibit superior antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity in vitro and superior efficacy in vivo compared with wild-type IgG1. Hence, compared with wild-type antibodies,

- 2 -

antibodies with such substitutions are expected to show superior efficacy at the same dose or comparable efficacy at a lower dose and/or with lesser frequency of dosing in human.

Another method to lower the dose and/or frequency of dosing is to reduce the elimination of an IgG antibody. The long half-life of IgG antibodies is reported to be dependent on its binding to FcRn. Therefore, substitutions that increase the binding affinity of IgG to FcRn at pH 6.0 while maintaining the pH dependence of the interaction by engineering the constant region have been extensively studied (Ghetie et al., *Nature Biotech.* 15: 637-640, 1997; Hinton et al., *JBC* 279: 6213-6216, 2004; Dall'Acqua et al., *J Immunol* 117: 1129-1138, 2006). Substitutions, such as M428L/N434S, led to increased half life and an increased pharmacodynamic effect in the variants (Zalevsky et al., *Nature Biotech.* 28: 157-159, 2010). Several works have reported successful increase in the half-life by introducing substitutions such as T250Q/M428L or M252Y/S254T/T256E to increase binding to FcRn at an acidic pH. In a non-human primate pharmacokinetic study, T250Q/M428L substitution to IgG1 showed a half-life of 35 days, a significant increase over the 14-day half-life of wild-type IgG1 (Hinton et al., *J Immunol* 176: 346-356, 2006).

Although substitutions in the constant region are able to significantly improve the functions of therapeutic IgG antibodies, substitutions in the strictly conserved constant region have the risk of immunogenicity in human (Presta, supra, 2008; De Groot and Martin, *Clin Immunol* 131: 189-201, 2009) and substitution in the highly diverse variable region sequence might be less immunogenic. Reports concerned with the variable region include engineering the CDR residues to improve binding affinity to the antigen (Rothe et al., *Expert Opin Biol Ther* 6: 177-187, 2006; Bostrom et al., *Methods Mol Biol* 525: 353-376, 2009; Thie et al., *Methods Mol Biol* 525: 309-322, 2009) and engineering the CDR and framework residues to improve stability (Wörn and Plückthun, *J Mol Biol* 305: 989-1010, 2001; Ewert et al., *Methods* 34: 184-199, 2004) and decrease immunogenicity risk (De Groot and Martin, supra, 2009; Jones et al., *Methods Mol Bio* 525: 405-423, xiv, 2009). As reported, improved affinity to the antigen can be achieved by affinity maturation using the phage or ribosome display of a randomized library. Improved stability can be rationally obtained from sequence- and structure-based rational design. Decreased immunogenicity risk (deimmunization) can be accomplished by various humanization methodologies and the removal of T-cell epitopes, which can

- 3 -

be predicted using in silico technologies or determined by in vitro assays. Additionally, variable regions have been engineered to lower pI. A longer half life was observed for these antibodies as compared to wild type antibodies despite comparable FcRn binding (Igawa et al., PEDS, Advance Access, doi: 10.1093/protein/gzq009, 2010).

5 The present invention relates to engineering or selecting antibodies with pH dependent antigen binding to modify antibody and/or antigen half life. IgG2 antibody half life can be shortened if antigen-mediated clearance mechanisms normally degrade the antibody when bound to the antigen. Similarly, the antigen:antibody complex can impact the half-life of the antigen, either extending half-life by protecting the antigen
10 from the typical degradation processes, or shortening the half-life via antibody-mediated degradation. The present invention relates to antibodies with higher affinity for antigen at pH 7.4 as compared to endosomal pH (i.e., pH 5.5-6.0) such that the K_D ratio at pH 5.5/ pH 7.4 or at pH 6.0/ pH 7.4 is 2 or more.

 The invention relates to an antibody with such pH dependent binding to its
15 antigen, and methods of designing, making and using such antibodies. Examples of useful antibodies target antigens such as proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9), also known as NARC-1, IgE, dickkopf-related protein 1 (DKK1), Complement 5 (C5), sclerostin (SOST) and GMCSF receptor.

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

Summary of the Invention

 The present invention relates to antibodies with pH dependent binding to its antigen such that the affinity for antigen binding at physiological pH (i.e., pH 7.4) is
30 greater than at endosomal pH (i.e., pH 6.0 or 5.5). In other words, the K_D or k_{off} ratio at pH 5.5/ pH 7.4 or at pH 6.0/ pH 7.4 is more than, or ranges between, 2, 3, 4, 8, 10, 16, 20, 30, 40, or 100 or more. Such pH dependent antibodies preferentially dissociate from the antigen in the endosome. This can increase antibody half life, as compared to

- 4 -

antibodies with equivalent K_D s at pH 7.4 but with no pH dependent binding, when the antigen is one that undergoes antigen-mediated clearance (e.g., PCSK9). Antibodies with pH dependent binding can decrease total antigen half life when the antigen undergoes reduced clearance when bound to antibody (e.g., IL6). Antibodies with pH dependent binding can also prolong the antibody-mediated decrease in antigen which is not antibody-bound. This can be important when antagonizing a target antigen typically present at high levels (e.g., IgE, DKK1, C5 and SOST). In addition, such antibodies can increase antigen half life when the antigen is a receptor and the receptor has increased clearance when bound to antibody (e.g., GMCSF receptor). In any embodiment of the invention described below, the K_D and k_{off} can be measured at either 25°C or 37°C.

In a preferred embodiment, the antibody with pH dependent binding which specifically binds an antigen with higher affinity at pH 7.4 than at pH 6.0, wherein the K_D ratio and/or the k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 and at 25°C is more than, or ranges between, 2, 3, 4, 8, 10, 16, or more, and wherein the antibody has reduced plasma clearance in vivo when exposed to said antigen as compared to an antibody without pH dependent binding that has a similar affinity for the antigen at pH 7.4, but has a comparable K_D and/or k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 that is less than 2. Preferably, the antigen is not interleukin-6 receptor (IL6R), or, preferably, the antibody is not an anti-IL6R antibody Fv3-m73, Fv4-m73 or H3pl/L73 as disclosed in WO 2010/106812 or WO 2009/041621.

In another preferred embodiment, the antibody with pH dependent binding which specifically binds an antigen with higher affinity at pH 7.4 than at pH 6.0, wherein the K_D ratio and/or the k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 and at 25°C is more than, or ranges between, 2, 3, 4, 8, 10, 16, or more, and wherein the antigen is both membrane bound and soluble in vivo and wherein the antibody mediates increased localization to a cell membrane receptor as compared to an antibody that has a similar affinity for the antigen at pH 7.4 but has a comparable K_D and/or k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 that is less than 2.

Preferably, the antigen is not the IL6R or, preferably, the antibody is not an anti-IL6R antibody Fv3-m73, Fv4-m73 or H3pl/L73 as disclosed in WO 2010/106812 or WO 2009/041621. In another preferred embodiment, the antigen is a soluble receptor that is a non-signaling decoy. In still other preferred embodiments, the antibody with pH dependent binding is an antibody drug conjugate, mediates antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), and/or complement-dependent cytotoxicity (CDC).

- 5 -

The invention includes an antibody with pH dependent binding which specifically binds an antigen with higher affinity at pH 7.4 than at pH 6.0, wherein the K_D ratio and/or the k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 and at 25°C is more than, or ranges between, 2, 3, 4, 8, 10, 16, or more, and wherein the decrease in the in vivo amount of non-antibody bound antigen is prolonged when exposed to said antibody as compared to an antibody without pH dependent binding that has a similar affinity for the antigen at pH 7.4, but has a comparable K_D and/or k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 that is less than 2.

The invention provides an antibody with pH dependent binding which specifically binds an antigen with higher affinity at pH 7.4 than at pH 6.0, wherein the K_D ratio and/or the k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 and at 25°C is more than, or ranges between, 2, 3, 4, 8, 10, 16, or more, and wherein there is a decrease in the vivo amount of antibody-bound antigen as compared to an antibody without pH dependent binding that has a similar affinity for the antigen at pH 7.4, but has a comparable K_D and/or k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 that is less than 2. In a preferred embodiment, the antigen is osteopontin.

The invention also provides for an agonist antibody with pH dependent binding which specifically binds an antigen with higher affinity at pH 7.4 than at pH 6.0, wherein the K_D ratio and/or the k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 and at 25°C is more than, or ranges between, 2, 3, 4, 8, 10, 16, or more, and wherein the antigen is a receptor and the receptor has reduced clearance in vivo when exposed to said antibody as compared to an antibody that has similar affinity for the receptor at pH 7.4, but has a comparable K_D and/or k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 that is less than 2. In a preferred embodiment, the receptor is GMCSF receptor.

In other preferred embodiments of any of the preceding antibodies, the K_D ratio or k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 is more than, or ranges between, 20, 30, 40 or 100 or more.

In other preferred embodiments, the preferred K_D ratio or k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 ranges between 2-3, 2-4, 2-8, 2-10, 2-16, or 2-20 or more, or 3-4, 3-8, 3-10, 3-16 or 3-20, or 4-8, 4-10, 4-16, or 4-20 or more, or 8 to 10, 8-16, 8-20 or more, 10-16, 10-20 or more, or 16-20 or more.

In other preferred embodiments of the previously described antibodies, the antibody binding to the antigen at pH 7.4 and at pH 25°C has a K_D of about 0.01 nM to about 100 nM, or, more preferably, at about 0.1 nM to about 10 nM.

- 6 -

In other preferred embodiments of the previously described antibodies, the binding of the antibody to the antigen at pH 7.4 has a k_{off} of about $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ to about $1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, more preferably, about $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ to about $1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$.

5 In another preferred embodiment of the previously described antibodies, the antigen is PCSK9. In one preferred embodiment, the anti-PCSK9 antibody is not PCSK9 antibody H1M300N (see US2010/0166768). In other preferred embodiments, the antigen is IgE, C5, or DKK1 and, in preferred embodiments, the K_D ranges between 1.0 nM to about 10 nM or between 1.0 nM to about 100 nM.

The invention also provides a method of extending interval dosing and/or
10 decreasing the therapeutic dose for treating a patient with a therapeutic antibody, said method comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the antibody of any of the previously described antibodies of the invention, wherein said antibody has an extended pharmacodynamic effect and/or half life as compared to an antibody that has similar affinity at pH 7.4, but has a K_D ratio and/or k_{off} ratio at pH
15 6.0/7.4 and at 25°C that is less than 2.

Also contemplated by the invention is a method of making an antibody with prolonged half-life and/or pharmacodynamic effect by regulating antibody binding affinity in a pH dependent manner, said method comprising selecting for antibody CDR histidine residues or other residues that optimize the microenvironment affecting pK_a , such that
20 antibody antigen binding has a K_D ratio and/or k_{off} ratio at pH 6.0/pH7.4 that is more than, or ranges between, 2, 3, 4, 8, 10, 16, or more. The invention also contemplates antibodies made by this method, including antibodies with 1, 2, 3, 4, 5, or more histidine substitutions in CDR residues that optimize the microenvironment affecting pK_a .

In a preferred embodiment of the above-described method, the method further
25 comprises mutagenizing the antibody to achieve antibody affinity with a K_D at pH 7.4 of at least 100 nM as measured at 25°C. In another embodiment, the invention provides for an antibody library enriched for histidines in CDR residues or other residues that optimize the microenvironment affecting pK_a .

In other preferred embodiments, the invention provides an isolated antibody
30 which specifically binds to PCSK9 and comprises a heavy chain variable region (VH) complementary determining region one (CDR1), a VH CDR2, and a VH CDR3 from the VH amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4 or 5 or a variant thereof having one, two, three or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3.

- 7 -

In a preferred embodiment, the antibody further comprises the light chain variable region (VL) CDR1, CDR2, and CDR3 of the VL amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 3 or a variant thereof having one, two, three or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3.

5 The invention also provides for isolated antibody which specifically binds to PCSK9 and comprises a heavy chain variable region (VH) complementary determining region one (CDR1) having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:6, a VH CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:7, and/or VH CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:8, or a variant thereof having one
10 or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3, as well as an isolated antibody which specifically binds PCSK9 and comprises a VH CDR1 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:6, a VH CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:7, and/or VH CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:9, or a variant thereof having one, two, three or more conservative
15 amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3.

In a further embodiment, the invention contemplates an isolated antibody comprising a light chain variable region (VL) CDR1 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:10, a VL CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:11, and/or VL CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:12, or a
20 variant thereof having one, two, three or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3.

In preferred embodiments of the above, the antibody further comprises a VL CDR1 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:10, a VL CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:11, and/or VL CDR3 having the amino acid
25 sequence shown in SEQ ID NO:12, or a variant thereof having one, two, three or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3, preferably, the VH region comprises SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 5 and the VL region comprises SEQ ID NO: 3, or a variant thereof having one, two, three or more conservative amino acid substitutions in SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 and/or SEQ ID NO: 3.

30 In another preferred embodiment of the PCSK9 antibodies of the present invention, the antibody has one or more Fc mutations, preferably, N434S, N434H, M428L-N434H double mutant, M428L-N434A double mutant, T250Q-M428L double mutant, and M428L-N434S double mutant

- 8 -

In another embodiment, the invention provides for an antibody or antigen-binding portion thereof, encoded by the plasmids deposited at the ATCC and having ATCC Accession No. PTA-10547, or PTA-10548, and/or PTA-10549.

Also contemplated by the invention are pharmaceutical compositions comprising
5 a therapeutically effective amount of any of the above described antibodies, a host cell that recombinantly produces the antibody of any of the previously described antibodies, an isolated nucleic acid encoding any of the previously described antibodies, and an isolated nucleic acid encoding any of the previously described antibodies.

Also contemplated by the invention is a method for reducing a level of LDL-
10 cholesterol in blood of a subject in need thereof, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of any of the antibodies of the invention targeting the PCSK9 antigen.

Brief Description of the Figures/Drawings

15 Figure 1 is a graph showing the increase in antibody concentration over time as a function of the K_D ratio.

Figure 2 is a graph showing the decrease in free ligand (antigen) over time as a function of the K_D ratio.

Figure 3 is a graph showing the effect of changing k_{off} and k_{on} on antibody
20 concentration over time.

Figure 4 is a heatmap display showing how many days longer an antibody with pH dependent binding would decrease serum antigen concentration as a function of K_D (R), serum half-life of antigen and serum concentration of antigen. R is equivalent to the K_D ratio at endosomal pH versus physiologic pH.

25 Figure 5 validates the predictability of the pH dependent antibody modeling. The model successfully predicted the total antibody concentration for 5A10 (Figure 5A). Figure 5B is a graph demonstrating the time course effect of 5A10 on LDL.

Figure 6 also validates the predictability of the pH dependent antibody modeling. The model successfully predicted the total antibody concentration for
30 5L1721H23_6L3H3 (6L3H3) (Figure 6A). Figure 6B is a graph demonstrating the time course effect of 6L3H3 on LDL. The pH dependent binding antibody 6L3H3 extended the interval in which LDL was lowered as compared to 5A10.

- 9 -

Figure 7 shows the time course of the total cholesterol effect when administering various PCSK9 antibodies. Figure 7A shows the dose dependent effect of 5A10 on total cholesterol. Figure 7B shows the dose dependent effect of pH dependent antibody 5L1721H23_6H3. This effect is extended as compared to the effect of 5A10.

5 Figure 8 is a graph which shows that antibodies with pH dependent binding, 5L1721H23_6H3 and 5L1721H23_6L3H3, have reduced antibody degradation and an extended half life as compared to antibodies without pH dependent binding. Figure 8B is a graph which demonstrates that the effect shown in Figure 8A is due to target mediated degradation. Degradation of antibody in PCSK9 null mice increased
10 dramatically following injection of PCSK9.

Figure 9 is a graph which illustrates the effect of pH sensitive PCSK9 antagonist antibodies and non-pH sensitive PCSK9 antagonist antibodies on cholesterol levels in monkeys. While no dramatic change in HDL levels were detected (Figure 9A), the pH sensitive antibodies mediated a more prolonged reduction in LDL levels as compared to
15 non-pH dependent antibody L1L3.

Figure 10 is a graph demonstrating that the PCSK9 antibodies with pH dependent binding had a prolonged half life in vivo as compared to the non-pH dependent antibodies.

Figure 11 is a heatmap showing the general modeling for pH dependent binding.
20 Such antibodies directed against antigens DKK1, IgE, or C5, can significantly increase the number of days the antigen experienced reduced levels of antigen as compared to an antibody without pH dependent binding.

Figure 12 models the time course for antigen concentration following administration of an antibody with pH dependent binding directed against antigen IgE.

25 Figure 13 models the time course for antigen concentration following administration of an antibody with pH dependent binding directed against antigen DKK1.

Figure 14 models the time course for antigen concentration following administration of an antibody with pH dependent binding directed against antigen C5.

Figure 15 details the trafficking model for antibodies with pH dependent binding
30 used for modeling.

Detailed Description of the Invention

The present invention relates to antibodies with pH dependent binding to its antigen such that the affinity for antigen binding at physiological pH (i.e., pH 7.4) is

- 10 -

greater than at endosomal pH (i.e., pH 6.0 or 5.5). In other words, the K_D or k_{off} ratio at pH 5.5/ pH 7.4 or at pH 6.0/ pH 7.4 is more than, or ranges between, 2, 3, 4, 8, 10, 16, 20, 30, 40, or 100 or more. Such pH dependent antibodies preferentially dissociate from the antigen in the endosome. This can increase antibody half life in the circulation, as compared to antibodies with equivalent K_D s at pH 7.4 but with no pH dependent binding, when the antigen is one that undergoes antigen-mediated clearance (e.g., PCSK9). Antibodies with pH dependent binding can decrease the average total antigen half life when the antigen undergoes reduced clearance when bound to antibody (e.g., IL6). Antibodies with pH dependent binding can also prolong the decrease in antigen which is not antibody-bound. This can be important when antagonizing a target antigen typically present at high levels (e.g., IgE, DKK1, C5 and SOST). In addition, such antibodies can increase antigen half life when the antigen is a receptor and the receptor has increased clearance when bound to antibody (e.g., GMCSF receptor).

If the antigen mediates target-mediated degradation, then using such antibodies with pH dependent binding to achieve dissociation in the endosome can increase the pharmacodynamic effect of the antibody, for example, when the antigen undergoes target-mediated clearance (e.g., PCSK9). The antibody with pH dependent binding dissociates from the antigen, escapes antigen-mediated degradation, can recycle out of the cell via FcRn binding and will have a longer half-life than an antibody with similar K_D at pH 7.4 but with no pH dependent binding.

Using such antibodies with pH dependent binding is also useful therapeutically when the soluble antigen is present at high concentration (e.g., IgE, C5, DKK1, or SOST). Upon dissociation from the antigen in the endosome and antigen degradation in the lysosome, the antibody can recycle into the plasma to bind additional free antigen, can prolong the decrease in non-antibody bound antigen, and can decrease the therapeutic dose required, as compared to an antibody with similar K_D at pH 7.4 but without pH dependent binding.

Additionally, using antibodies with pH dependent binding can be useful when the antigen is present in membrane bound as well as soluble form, e.g., a receptor, and it is desired to enhance binding to the membrane bound form. By dissociating from the soluble form, the antibody has the increased opportunity to re-bind to the membrane form, increasing antibody in proximity to the cell membrane. If bound to the membrane

- 11 -

form in a divalent manner, the effective affinity may be higher, or the effective dissociation rate may be slower, through the effect of avidity.

This has application for using antibody-drug conjugates (ADCs) when targeting an antigen present in both membrane-bound and soluble form. In FcRn-containing cells in the endothelium, soluble antigen will be cleared with the ADC recycling to the plasma compartment, allowing for opportunity to bind membrane bound antigen. With antibodies with pH dependent binding, increased binding to the membrane bound form, either divalently or monovalently, will cause increased antibody internalization with the membrane bound antigen and cell death. If bound to the receptor in a divalent matter, the avidity may increase the effective affinity or slow the effective rate of dissociation.

The mechanism for ADCC and complement dependent cytotoxicity (CDC) can also be exploited in using antibodies with pH dependent binding. In FcRn-containing cells in the endothelium, soluble antigen will be cleared and the ADC recycled to the plasma compartment, allowing for the opportunity to bind membrane-bound antigen. Liberating the antibodies from the soluble receptor will increase the free antibody available that can then bind to membrane bound antigen and increase cell killing.

General Techniques

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology (including recombinant techniques), microbiology, cell biology, biochemistry and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature, such as, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et

- 12 -

al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Definitions

10 An "antibody" is an immunoglobulin molecule capable of specific binding to a target, such as a carbohydrate, polynucleotide, lipid, polypeptide, etc., through at least one antigen recognition site, located in the variable region of the immunoglobulin molecule. As used herein, the term encompasses not only intact polyclonal or monoclonal antibodies, but also any antigen binding fragment thereof (i.e., "antigen-binding portion") or single chain thereof, fusion proteins comprising an antibody, and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site, including, for example without limitation, single chain (scFv) and domain antibodies (e.g., human, camelid, or shark domain antibodies), maxibodies, minibodies, intrabodies, diabodies, triabodies, tetrabodies, vNAR and bis-scFv (see e.g., Hollinger and Hudson, Nature Biotech 23: 1126-1136, 2005). An antibody includes an antibody of any class, such as IgG, IgA, or IgM (or sub-class thereof), and the antibody need not be of any particular class. Depending on the antibody amino acid sequence of the constant domain of its heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called alpha, delta, epsilon, gamma, and mu, respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

30 The term "antigen binding portion" of an antibody, as used herein, refers to one or more fragments of an intact antibody that retain the ability to specifically bind to a given antigen (e.g., target X). Antigen binding functions of an antibody can be performed by fragments of an intact antibody. Examples of binding fragments

- 13 -

encompassed within the term "antigen binding portion" of an antibody include Fab, Fab', F(ab')₂, an Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains, an Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody, a single domain antibody (dAb) fragment (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), and an isolated
5 complementarity determining region (CDR).

As used herein, the "CDRs" may be defined in accordance with any of Kabat, Chothia, extended, AbM, contact, and/or conformational definitions. The identity of the amino acid residues in a particular antibody that make up a CDR can be determined using methods well known in the art. As used herein, antibody CDRs may be identified
10 as the hypervariable regions originally defined by Kabat et al. See, e.g., Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. The positions of the CDRs may also be identified as the structural loop structures originally described by Chothia and others. See, e.g., Chothia et al., Nature 342:877-883, 1989. Other approaches to CDR identification include the
15 "AbM definition," which is a compromise between Kabat and Chothia and is derived using Oxford Molecular's AbM antibody modeling software (now Accelrys®), or the "contact definition" of CDRs based on observed antigen contacts, set forth in MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745, 1996. In another approach, referred to herein as the "conformational definition" of CDRs, the positions of the CDRs may be identified as the
20 residues that make enthalpic contributions to antigen binding. See, e.g., Makabe et al., Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166, 2008. Still other CDR boundary definitions may not strictly follow one of the above approaches, but will nonetheless overlap with at least a portion of the Kabat CDRs, although they may be shortened or lengthened in light of prediction or experimental findings that particular residues or
25 groups of residues or even entire CDRs do not significantly impact antigen binding. As used herein, a CDR may refer to CDRs defined by any approach known in the art, including combinations of approaches.

As used herein, "monoclonal antibody" refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies
30 comprising the population are identical except for possible naturally-occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to polyclonal antibody preparations, which typically include different antibodies directed against different

- 14 -

determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495, or may be made by recombinant DNA methods such as described in U.S. Pat. No. 4,816,567. The monoclonal antibodies may also be isolated from phage libraries generated using the techniques described in McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554, for example.

As used herein, "humanized" antibody refers to forms of non-human (e.g., murine) antibodies that are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains, or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen-binding subsequences of antibodies) that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. Preferably, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, or rabbit having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, Fv framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, the humanized antibody may comprise residues that are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences, but are included to further refine and optimize antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region or domain (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Preferred are antibodies having Fc regions modified as described in WO 99/58572. Other forms of humanized antibodies have one or more CDRs (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2, and/or CDR H3) which are altered with respect to the original antibody, which are also termed one or more CDRs "derived from" one or more CDRs from the original antibody.

- 15 -

As used herein, "human antibody" means an antibody having an amino acid sequence corresponding to that of an antibody that can be produced by a human and/or which has been made using any of the techniques for making human antibodies known to those skilled in the art or disclosed herein. This definition of a human antibody includes antibodies comprising at least one human heavy chain polypeptide or at least one human light chain polypeptide. One such example is an antibody comprising murine light chain and human heavy chain polypeptides. Human antibodies can be produced using various techniques known in the art. In one embodiment, the human antibody is selected from a phage library, where that phage library expresses human antibodies (Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581). Human antibodies can also be made by immunization of animals into which human immunoglobulin loci have been transgenically introduced in place of the endogenous loci, e.g., mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. This approach is described in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; and 5,661,016. Alternatively, the human antibody may be prepared by immortalizing human B lymphocytes that produce an antibody directed against a target antigen (such B lymphocytes may be recovered from an individual or may have been immunized in vitro). See, e.g., Cole et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77, 1985; Boerner et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; and U.S. Patent No. 5,750,373.

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

- 16 -

Molec. Biol. 273:927-948). As used herein, a CDR may refer to CDRs defined by either approach or by a combination of both approaches.

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

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

As used herein, a "PCSK9 antagonist antibody" refers to an antibody that is able to inhibit PCSK9 biological activity and/or downstream pathway(s) mediated by PCSK9 signaling, including PCSK9-mediated down-regulation of the LDLR, and PCSK9-mediated decrease in LDL blood clearance. A pH dependent PCSK9 antagonist antibody encompasses antibodies that block, antagonize, suppress or reduce (to any degree including significantly) PCSK9 biological activity, including downstream pathways mediated by PCSK9 signaling, such as LDLR interaction and/or elicitation of a cellular response to PCSK9. For purpose of the present invention, it will be explicitly understood that the term "PCSK9 antagonist antibody" encompasses all the previously identified terms, titles, and functional states and characteristics whereby the PCSK9 itself, a PCSK9 biological activity (including but not limited to its ability to mediate any aspect of interaction with the LDLR, down regulation of LDLR, and decreased blood LDL clearance), or the consequences of the biological activity, are substantially nullified, decreased, or neutralized in any meaningful degree. In some embodiments, a pH dependent PCSK9 antagonist antibody binds PCSK9 and prevents interaction with the LDLR. Examples of PCSK9 antagonist antibodies are provided herein.

The terms "polypeptide", "oligopeptide", "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to chains of amino acids of any length, preferably, relatively short (e.g., 10-100 amino acids). The chain may be linear or branched, it may comprise modified amino acids, and/or may be interrupted by non-amino acids. The terms also encompass an amino acid chain that has been modified naturally or by intervention; for example, disulfide bond formation, glycosylation, lipidation, acetylation,

- 17 -

phosphorylation, or any other manipulation or modification, such as conjugation with a labeling component. Also included within the definition are, for example, polypeptides containing one or more analogs of an amino acid (including, for example, unnatural amino acids, etc.), as well as other modifications known in the art. It is understood that the polypeptides can occur as single chains or associated chains.

As known in the art, "polynucleotide," or "nucleic acid," as used interchangeably herein, refer to chains of nucleotides of any length, and include DNA and RNA. The nucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, modified nucleotides or bases, and/or their analogs, or any substrate that can be incorporated into a chain by DNA or RNA polymerase. A polynucleotide may comprise modified nucleotides, such as methylated nucleotides and their analogs. If present, modification to the nucleotide structure may be imparted before or after assembly of the chain. The sequence of nucleotides may be interrupted by non-nucleotide components. A polynucleotide may be further modified after polymerization, such as by conjugation with a labeling component. Other types of modifications include, for example, "caps", substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, internucleotide modifications such as, for example, those with uncharged linkages (e.g., methyl phosphonates, phosphotriesters, phosphoamidates, carbamates, etc.) and with charged linkages (e.g., phosphorothioates, phosphorodithioates, etc.), those containing pendant moieties, such as, for example, proteins (e.g., nucleases, toxins, antibodies, signal peptides, poly-L-lysine, etc.), those with intercalators (e.g., acridine, psoralen, etc.), those containing chelators (e.g., metals, radioactive metals, boron, oxidative metals, etc.), those containing alkylators, those with modified linkages (e.g., alpha anomeric nucleic acids, etc.), as well as unmodified forms of the polynucleotide(s). Further, any of the hydroxyl groups ordinarily present in the sugars may be replaced, for example, by phosphonate groups, phosphate groups, protected by standard protecting groups, or activated to prepare additional linkages to additional nucleotides, or may be conjugated to solid supports. The 5' and 3' terminal OH can be phosphorylated or substituted with amines or organic capping group moieties of from 1 to 20 carbon atoms. Other hydroxyls may also be derivatized to standard protecting groups. Polynucleotides can also contain analogous forms of ribose or deoxyribose sugars that are generally known in the art, including, for example, 2'-O-methyl-, 2'-O-allyl, 2'-fluoro- or 2'-azido-ribose, carbocyclic sugar analogs, alpha- or beta-anomeric sugars, epimeric sugars such as

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

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

A "non-signalling decoy" is a soluble receptor isoform or a binding protein that sequesters ligand from its cognate receptor(s).

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

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

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

As used in the art, "Fc receptor" and "FcR" describe a receptor that binds to the Fc region of an antibody. The preferred FcR is a native sequence human FcR. Moreover, a preferred FcR is one which binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the FcγRI, FcγRII, and FcγRIII subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. FcγRII receptors include FcγRIIA (an "activating receptor") and FcγRIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92; Capel et al., 1994, Immunomethods, 4:25-34; and de Haas et al., 1995, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41. "FcR" also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer et al., 1976 J. Immunol., 117:587; and Kim et al., 1994, J. Immunol., 24:249).

The term "compete", as used herein with regard to an antibody, means that a first antibody, or an antigen-binding portion thereof, binds to an epitope in a manner sufficiently similar to the binding of a second antibody, or an antigen-binding portion thereof, such that the result of binding of the first antibody with its cognate epitope is detectably decreased in the presence of the second antibody compared to the binding of the first antibody in the absence of the second antibody. The alternative, where the binding of the second antibody to its epitope is also detectably decreased in the presence of the first antibody, can, but need not be the case. That is, a first antibody can inhibit the binding of a second antibody to its epitope without that second antibody inhibiting the binding of the first antibody to its respective epitope. However, where each antibody detectably inhibits the binding of the other antibody with its cognate epitope or ligand, whether to the same, greater, or lesser extent, the antibodies are said

- 20 -

to “cross-compete” with each other for binding of their respective epitope(s). Both competing and cross-competing antibodies are encompassed by the present invention. Regardless of the mechanism by which such competition or cross-competition occurs (e.g., steric hindrance, conformational change, or binding to a common epitope, or portion thereof), the skilled artisan would appreciate, based upon the teachings provided herein, that such competing and/or cross-competing antibodies are encompassed and can be useful for the methods disclosed herein.

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

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

By “Minimal Anticipated Biological Effect Level (MABEL)” is meant the minimal anticipated dose level leading to a minimal biological effect in humans. Safety factors are usually applied for the calculation for the first dose in man from MABEL. The calculation of MABEL should utilize all relevant in vitro and in vivo pharmacokinetic and pharmacodynamic information.

- 21 -

As used herein, "treatment" and "therapeutically effective" are approaches for obtaining beneficial or desired clinical results. For purposes of this invention related to pH dependent PCSK9 antagonist antibodies, beneficial or desired clinical results include, but are not limited to, one or more of the following: enhancement of LDL clearance and reducing incidence or amelioration of aberrant cholesterol and/or lipoprotein levels resulting from metabolic and/or eating disorders, or including familial hypercholesterolemia, atherogenic dyslipidemia, atherosclerosis, and, more generally, cardiovascular disease (CVD).

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

10 "Ameliorating" means a lessening or improvement of one or more symptoms after administering a treatment as compared to not administering a treatment. "Ameliorating" also includes shortening or reduction in duration of a symptom.

As used herein, an "effective dosage" or "effective amount" of drug, compound, or pharmaceutical composition is an amount sufficient to affect any one or more beneficial or desired results. For prophylactic use, beneficial or desired results include eliminating or reducing the risk, lessening the severity, or delaying the outset of the disease, including biochemical, histological and/or behavioral symptoms of the disease, its complications and intermediate pathological phenotypes presenting during development of the disease. For therapeutic use of a pH dependent PCSK9 antagonist antibody, beneficial or desired results include clinical results such as reducing hypercholesterolemia or one or more symptoms of dyslipidemia, atherosclerosis, CVD, or coronary heart disease, decreasing the dose of other medications required to treat the disease, enhancing the effect of another medication, and/or delaying the progression of the disease of patients. An effective dosage can be administered in one or more administrations. For purposes of this invention, an effective dosage of drug, compound, or pharmaceutical composition is an amount sufficient to accomplish prophylactic or therapeutic treatment either directly or indirectly. As is understood in the

20
25
30

- 22 -

clinical context, an effective dosage of a drug, compound, or pharmaceutical composition may or may not be achieved in conjunction with another drug, compound, or pharmaceutical composition. Thus, an "effective dosage" may be considered in the context of administering one or more therapeutic agents, and a single agent may be
5 considered to be given in an effective amount if, in conjunction with one or more other agents, a desirable result may be or is achieved.

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

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

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

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" or "pharmaceutical acceptable excipient" includes any material which, when combined with an active ingredient, allows the ingredient to retain biological activity and is non-reactive with the subject's immune system. Examples include, but are not limited to, any of the standard
25 pharmaceutical carriers such as a phosphate buffered saline solution, water, emulsions such as oil/water emulsion, and various types of wetting agents. Preferred diluents for aerosol or parenteral administration are phosphate buffered saline (PBS) or normal (0.9%) saline. Compositions comprising such carriers are formulated by well known conventional methods (see, for example, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; and Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Mack Publishing, 2000).
30

The term " k_{on} ", as used herein, refers to the rate constant for association of an antibody to an antigen. Specifically, the rate constants (k_{on} and k_{off}) and equilibrium

- 23 -

dissociation constants are measured using Fab antibody fragments (i.e., univalent) and antigen.

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

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

Determinations of the association and dissociation rate constants, k_a and k_d respectively, to determine K_D and k_{off} ratios, are made using a surface plasmon resonance-based biosensor to characterize an analyte/ligand interaction under
10 conditions where the analyte is monovalent with respect to binding a ligand that is immobilized at low capacity onto a sensor surface via a capture reagent. The analysis is performed using a kinetic titration methodology as described in Karlsson et al., *Anal. Biochem* 349, 136-147, 2006. The sensor chip, capturing reagent, and assay buffer employed for a given assay are chosen to give stable capture of ligand onto the sensor
15 surface, minimize non-specific binding of the analyte to the surfaces, and yield analyte-binding responses that are appropriate for kinetic analysis, per the recommendations in Myszkka, J. *Mol. Recognit* 12, 279-284, 1999. The analyte-binding responses per analyte/ligand interaction are double referenced and fit to a 1:1 Langmuir "mass transport limited model" with k_a , k_d and R_{max} as global parameters as described in
20 Myszkka & Morton et al., *Biophys. Chem* 64, 127-137 (1997). The equilibrium dissociation constant, K_D , is deduced from the ratio of the kinetic rate constants, $K_D = k_d/k_a$. Such determinations preferably take place at 25°C or 37°C.

A. Methods for preventing or treating disorders

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

In a further aspect, the invention provides an effective amount of a pH dependent PCSK9 antagonist antibody that antagonizes circulating PCSK9 for use in treating or preventing hypercholesterolemia, and/or at least one symptom of dyslipidemia,

- 24 -

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

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

With respect to all methods described herein, reference to pH dependent antibodies against any appropriate antigen also includes compositions comprising one
20 or more additional agents. These compositions may further comprise suitable excipients, such as pharmaceutically acceptable excipients including buffers, which are well known in the art. The present invention can be used alone or in combination with other conventional methods of treatment.

The pH dependent antibody can be administered to an individual via any suitable
25 route. It should be apparent to a person skilled in the art that the examples described herein are not intended to be limiting but to be illustrative of the techniques available. Accordingly, in some embodiments, the pH dependent antibody is administered to an individual in accord with known methods, such as intravenous administration, e.g., as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal,
30 intracerebrospinal, transdermal, subcutaneous, intra-articular, sublingually, intrasynovial, via insufflation, intrathecal, oral, inhalation or topical routes. Administration can be systemic, e.g., intravenous administration, or localized. Commercially available nebulizers for liquid formulations, including jet nebulizers and

- 25 -

ultrasonic nebulizers are useful for administration. Liquid formulations can be directly nebulized and lyophilized powder can be nebulized after reconstitution. Alternatively, pH dependent antibody can be aerosolized using a fluorocarbon formulation and a metered dose inhaler, or inhaled as a lyophilized and milled powder.

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

 Various formulations of a pH dependent antibody may be used for administration. In some embodiments, the pH dependent antibody may be administered neat. In some
15 embodiments, pH dependent antibody and a pharmaceutically acceptable excipient may be in various formulations. Pharmaceutically acceptable excipients are known in the art, and are relatively inert substances that facilitate administration of a pharmacologically effective substance. For example, an excipient can give form or consistency, or act as a diluent. Suitable excipients include but are not limited to stabilizing agents, wetting and emulsifying agents, salts for varying osmolarity, encapsulating agents, buffers, and skin
20 penetration enhancers. Excipients as well as formulations for parenteral and nonparenteral drug delivery are set forth in Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Mack Publishing (2000).

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

 Antibodies with pH dependent binding can also be administered via inhalation, as described herein. Generally, for administration of pH dependent antibodies, an initial candidate dosage can be about 2 mg/kg. For the purpose of the present invention, a
30 typical daily dosage might range from about any of about 3 µg/kg to 30 µg/kg to 300 µg/kg to 3 mg/kg, to 30 mg/kg, to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For example, dosage of about 1 mg/kg, about 2.5 mg/kg, about 5 mg/kg, about 10 mg/kg, and about 25 mg/kg may be used. For repeated

- 26 -

administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of symptoms occurs or until sufficient therapeutic levels are achieved, for example, to reduce blood LDL levels. An exemplary dosing regimen comprises administering an initial dose of about 2 mg/kg, followed by a weekly
5 maintenance dose of about 1 mg/kg of the antibody, or followed by a maintenance dose of about 1 mg/kg every other week. However, other dosage regimens may be useful, depending on the pattern of pharmacokinetic decay that the practitioner wishes to achieve. For example, in some embodiments, dosing from one to four times a week is contemplated. In other embodiments dosing once a month or once every other month
10 or every three months is contemplated. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays. The dosing regimen (including the antibody used) can vary over time.

For the purpose of the present invention, the appropriate dosage of a pH dependent antibody will depend on the antibody (or compositions thereof) employed, the
15 type and severity of symptoms to be treated, whether the agent is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the agent, the patient's blood antigen levels, the patient's synthesis and clearance rate for antigen, the patient's clearance rate for the administered agent, and the discretion of the attending physician. Typically the clinician will administer a pH
20 dependent antibody until a dosage is reached that achieves the desired result. Dose and/or frequency can vary over course of treatment. Empirical considerations, such as the half-life, generally will contribute to the determination of the dosage. For example, antibodies that are compatible with the human immune system, such as humanized antibodies or fully human antibodies, may be used to prolong half-life of the antibody
25 and to prevent the antibody being attacked by the host's immune system. Frequency of administration may be determined and adjusted over the course of therapy, and is generally, but not necessarily, based on treatment and/or suppression and/or amelioration and/or delay of symptoms, e.g., hypercholesterolemia. Alternatively, sustained continuous release formulations of antibodies may be appropriate. Various
30 formulations and devices for achieving sustained release are known in the art.

In one embodiment, dosages for an antagonist antibody may be determined empirically in individuals who have been given one or more administration(s) of an

- 27 -

antagonist antibody. Individuals are given incremental dosages of a antibody. To assess efficacy, an indicator of the disease can be followed.

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

In some embodiments, more than one antagonist antibody may be present. At least one, at least two, at least three, at least four, at least five different, or more antagonist antibodies and/or peptides can be present. Generally, those antibodies or peptides may have complementary activities that do not adversely affect each other. A pH dependent antibody can also be used in conjunction with other therapeutics. A pH dependent antibody can also be used in conjunction with other agents that serve to enhance and/or complement the effectiveness of the agents.

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

Liposomes containing the pH dependent antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang, et al., 1980, Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030; and U.S. Pat. Nos.

- 28 -

4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556. Particularly useful liposomes can be generated by the reverse phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Mack Publishing (2000).

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

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

Suitable emulsions may be prepared using commercially available fat emulsions, such as IntralipidTM, LiposynTM, InfonutrolTM, LipofundinTM and LipiphysanTM. The active ingredient may be either dissolved in a pre-mixed emulsion composition or alternatively it may be dissolved in an oil (e.g., soybean oil, safflower oil, cottonseed oil, sesame oil, corn oil or almond oil) and an emulsion formed upon mixing with a phospholipid (e.g.,

- 29 -

egg phospholipids, soybean phospholipids or soybean lecithin) and water. It will be appreciated that other ingredients may be added, for example glycerol or glucose, to adjust the tonicity of the emulsion. Suitable emulsions will typically contain up to 20% oil, for example, between 5 and 20%. The fat emulsion can comprise fat droplets
5 between 0.1 and 1.0 μm , particularly 0.1 and 0.5 μm , and have a pH in the range of 5.5 to 8.0.

The emulsion compositions can be those prepared by mixing a pH dependent antibody with IntralipidTM or the components thereof (soybean oil, egg phospholipids, glycerol and water).

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

B. pH dependent antibodies

The antibodies useful in the present invention can encompass monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, antibody fragments (e.g., Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), chimeric antibodies, bispecific antibodies, heteroconjugate antibodies, single chain (ScFv), mutants thereof, fusion proteins comprising an antibody portion (e.g., a domain antibody), human antibodies, humanized antibodies, and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site of the required specificity, including glycosylation variants of antibodies, amino acid
25 sequence variants of antibodies, and covalently modified antibodies. The antibodies may be murine, rat, human, or any other origin (including chimeric or humanized antibodies).

- 30 -

In some embodiments, the pH dependent antibody is a monoclonal antibody. The pH dependent antibody can also be humanized. In other embodiments, the antibody is human.

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

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

One way of determining binding affinity of antibodies to antigen is by measuring binding affinity of monofunctional Fab fragments of the antibody. To obtain monofunctional Fab fragments, an antibody (for example, IgG) can be cleaved with papain or expressed recombinantly. The affinity of a Fab fragment of an antibody can be determined by surface plasmon resonance (Biacore3000™ surface plasmon resonance (SPR) system, Biacore, INC, Piscataway NJ) equipped with pre-immobilized streptavidin sensor chips (SA) using HBS-EP running buffer (0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15 NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Surfactant P20). Biotinylated antigen can be diluted into HBS-EP buffer to a concentration of less than 0.5 µg/mL and injected across

- 31 -

the individual chip channels using variable contact times, to achieve two ranges of antigen density, either 50-200 response units (RU) for detailed kinetic studies or 800-1,000 RU for screening assays. Regeneration studies have shown that 25 mM NaOH in 25% v/v ethanol effectively removes the bound Fab while keeping the activity of antigen on the chip for over 200 injections. Typically, serial dilutions (spanning concentrations of 0.1-10x estimated K_D) of purified Fab samples are injected for 1 min at 100 μ L/minute and dissociation times of up to 2 hours are allowed. The concentrations of the Fab proteins are determined by ELISA and/or SDS-PAGE electrophoresis using a Fab of known concentration (as determined by amino acid analysis) as a standard. Kinetic association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are obtained simultaneously by fitting the data globally to a 1:1 Langmuir binding model (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B., 1994. *Methods Enzymology* 6. 99-110) using the BIAevaluation program. Equilibrium dissociation constant (K_D) values are calculated as k_{off}/k_{on} . This protocol is suitable for use in determining binding affinity of an antibody to any antigen, including human or another mammalian species (such as mouse, rat, primate). Binding affinity of an antibody is generally measured at 25°C, but can also be measured at 37°C.

The antibodies may be made by any method known in the art. The route and schedule of immunization of the host animal are generally in keeping with established and conventional techniques for antibody stimulation and production, as further described herein. General techniques for production of human and mouse antibodies are known in the art and/or are described herein. For pH dependent antibodies against PCSK9, a currently preferred method of making the antibodies comprises the immunization of PCSK9 knockout (PCSK9 $-/-$) animals as disclosed herein.

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

Hybridomas can be prepared from the lymphocytes and immortalized myeloma cells using the general somatic cell hybridization technique of Kohler, B. and Milstein, C., 1975, *Nature* 256:495-497 or as modified by Buck, D. W., et al., 1982, *In Vitro*, 18:377-381. Available myeloma lines, including but not limited to X63-Ag8.653 and those from the Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA, may be

- 32 -

used in the hybridization. Generally, the technique involves fusing myeloma cells and lymphoid cells using a fusogen such as polyethylene glycol, or by electrical means well known to those skilled in the art. After the fusion, the cells are separated from the fusion medium and grown in a selective growth medium, such as hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) medium, to eliminate unhybridized parent cells. Any of the media described herein, supplemented with or without serum, can be used for culturing hybridomas that secrete monoclonal antibodies. As another alternative to the cell fusion technique, EBV immortalized B cells may be used to produce the PCSK9 monoclonal antibodies of the subject invention. The hybridomas are expanded and subcloned, if desired, and supernatants are assayed for anti-immunogen activity by conventional immunoassay procedures (e.g., radioimmunoassay, enzyme immunoassay, or fluorescence immunoassay).

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

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

Once antibodies are generated or selected, the antibodies can be optimized for pH dependent binding, for example, as disclosed in Example 1 herein.

- 33 -

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

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

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

A number of "humanized" antibody molecules comprising an antigen-binding site derived from a non-human immunoglobulin have been described, including chimeric antibodies having rodent or modified rodent V regions and their associated CDRs fused to human constant domains. See, for example, Winter et al., 1991, Nature 349:293-299; Lobuglio et al., 1989, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224; Shaw et al., 1987, J Immunol. 138:4534-4538; and Brown et al., 1987, Cancer Res. 47:3577-3583. Other references describe rodent CDRs grafted into a human supporting framework region (FR) prior to fusion with an appropriate human antibody constant domain. See, for example, Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-327; Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-1536; and Jones et al., 1986, Nature 321:522-525. Another reference

- 34 -

describes rodent CDRs supported by recombinantly engineered rodent framework regions. See, for example, European Patent Publ. No. 0519596. These “humanized” molecules are designed to minimize unwanted immunological response toward rodent anti-human antibody molecules which limits the duration and effectiveness of therapeutic applications of those moieties in human recipients. For example, the antibody constant region can be engineered such that it is immunologically inert (e.g., does not trigger complement lysis). See, e.g., PCT Publ. No. WO99/58572; UK Patent Application No. 9809951.8. Other methods of humanizing antibodies that may also be utilized are disclosed by Daugherty et al., 1991, Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 and in U.S. Patent Nos. 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; 5,866,692; 6,210,671; and 6,350,861; and in PCT Publ. No. WO 01/27160.

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

In an alternative, antibodies may be made recombinantly and expressed using any method known in the art. In another alternative, antibodies may be made recombinantly by phage display technology. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; and 6,265,150; and Winter et al., 1994, Annu. Rev. Immunol. 12:433-455. Alternatively, the phage display technology (McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-553) can be used to produce human antibodies and antibody fragments in vitro, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. According to this technique, antibody V domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. Thus, the phage mimics some of the properties of the B cell. Phage display can be performed

- 35 -

in a variety of formats; see, e.g., Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., 1993, *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571. Several sources of V-gene segments can be used for phage display. Clackson et al., 1991, *Nature* 352:624-628 isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies from a small random combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated essentially following the techniques described by Mark et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, or Griffith et al., 1993, *EMBO J.* 12:725-734. In a natural immune response, antibody genes accumulate mutations at a high rate (somatic hypermutation). Some of the changes introduced will confer higher affinity, and B cells displaying high-affinity surface immunoglobulin are preferentially replicated and differentiated during subsequent antigen challenge. This natural process can be mimicked by employing the technique known as "chain shuffling." (Marks et al., 1992, *Bio/Technol.* 10:779-783). In this method, the affinity of "primary" human antibodies obtained by phage display can be improved by sequentially replacing the heavy and light chain V region genes with repertoires of naturally occurring variants (repertoires) of V domain genes obtained from unimmunized donors. This technique allows the production of antibodies and antibody fragments with affinities in the pM-nM range. A strategy for making very large phage antibody repertoires (also known as "the mother-of-all libraries") has been described by Waterhouse et al., 1993, *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266. Gene shuffling can also be used to derive human antibodies from rodent antibodies, where the human antibody has similar affinities and specificities to the starting rodent antibody. According to this method, which is also referred to as "epitope imprinting", the heavy or light chain V domain gene of rodent antibodies obtained by phage display technique is replaced with a repertoire of human V domain genes, creating rodent-human chimeras. Selection on antigen results in isolation of human variable regions capable of restoring a functional antigen-binding site, i.e., the epitope governs (imprints) the choice of partner. When the process is repeated in order to replace the remaining rodent V domain, a human antibody is obtained (see PCT Publ. No. WO 93/06213). Unlike traditional humanization of rodent antibodies by CDR grafting, this technique provides completely human antibodies, which have no framework or CDR residues of rodent origin.

- 36 -

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

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

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

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

DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of the monoclonal antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once
30 isolated, the DNA may be placed into expression vectors (such as expression vectors disclosed in PCT Publ. No. WO 87/04462), which are then transfected into host cells such as E. coli cells, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of

- 37 -

monoclonal antibodies in the recombinant host cells. See, e.g., PCT Publ. No. WO 87/04462. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences, Morrison et al., 1984, Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, or
5 by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. In that manner, "chimeric" or "hybrid" antibodies are prepared that have the binding specificity of a monoclonal antibody herein.

pH dependent antibodies and polypeptides derived from antibodies can be
10 identified or characterized using methods known in the art, whereby reduction, amelioration, or neutralization of biological activity is detected and/or measured. In some embodiments, a pH dependent antibody or polypeptide is identified by incubating a candidate agent with antigen and monitoring binding and/or attendant reduction or neutralization of a biological activity. The binding assay may be performed with purified
15 antigen polypeptide(s), or with cells naturally expressing, or transfected to express, te polypeptide(s). In one embodiment, the binding assay is a competitive binding assay, where the ability of a candidate antibody to compete with a known antagonist for binding is evaluated. The assay may be performed in various formats, including the ELISA format. In other embodiments, a pH dependent antibody is identified by incubating a
20 candidate agent with the antigen and monitoring binding and attendant inhibition of LDLR expression and/or blood cholesterol clearance.

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

Antibodies with pH dependent binding may be characterized using methods well known in the art. For example, one method is to identify the epitope to which it binds, or "epitope mapping." There are many methods known in the art for mapping and
30 characterizing the location of epitopes on proteins, including solving the crystal structure of an antibody-antigen complex, competition assays, gene fragment expression assays, and synthetic peptide-based assays, as described, for example, in Chapter 11 of Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory

- 38 -

Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999). In an additional example, epitope mapping can be used to determine the sequence to which a pH dependent antibody binds. Epitope mapping is commercially available from various sources, for example, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, The Netherlands). The epitope
5 can be a linear epitope, i.e., contained in a single stretch of amino acids, or a conformational epitope formed by a three-dimensional interaction of amino acids that may not necessarily be contained in a single stretch. Peptides of varying lengths (e.g., at least 4-6 amino acids long) can be isolated or synthesized (e.g., recombinantly) and used for binding assays with an antibody. In another example, the epitope to which the
10 pH dependent antibody binds can be determined in a systematic screening by using overlapping peptides derived from the antigen sequence and determining binding by the antibody. According to the gene fragment expression assays, the open reading frame encoding the antigen is fragmented either randomly or by specific genetic constructions and the reactivity of the expressed fragments of antigen with the antibody to be tested is
15 determined. The gene fragments may, for example, be produced by PCR and then transcribed and translated into protein in vitro, in the presence of radioactive amino acids. The binding of the antibody to the radioactively labeled fragments is then determined by immunoprecipitation and gel electrophoresis. Certain epitopes can also be identified by using large libraries of random peptide sequences displayed on the
20 surface of phage particles (phage libraries). Alternatively, a defined library of overlapping peptide fragments can be tested for binding to the test antibody in simple binding assays. In an additional example, mutagenesis of an antigen binding domain, domain swapping experiments and alanine scanning mutagenesis can be performed to identify residues required, sufficient, and/or necessary for epitope binding. For example,
25 domain swapping experiments can be performed using a mutant antigen in which various fragments of the polypeptide have been replaced (swapped) with sequences from antigen from another species, or a closely related, but antigenically distinct protein (such as another member of the proprotein convertase family). By assessing binding of the antibody to the mutant antigen, the importance of the particular antigen fragment to
30 antibody binding can be assessed.

Yet another method which can be used to characterize a pH dependent antibody is to use competition assays with other antibodies known to bind to the same antigen to

- 39 -

determine if the pH dependent antibody binds to the same epitope as other antibodies. Competition assays are well known to those of skill in the art.

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

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

Viral-based vectors for delivery of a desired polynucleotide and expression in a desired cell are well known in the art. Exemplary viral-based vehicles include, but are not limited to, recombinant retroviruses (see, e.g., PCT Publ. Nos. WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; U.S. Patent Nos. 5, 219,740 and 4,777,127; GB Patent No. 2,200,651; and EP Patent

- 40 -

No. 0 345 242), alphavirus-based vectors (e.g., Sindbis virus vectors, Semliki forest virus (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), Ross River virus (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) and Venezuelan equine encephalitis virus (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), and adeno-associated virus (AAV) vectors (see, e.g., PCT Publ. Nos. WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 and WO 95/00655). Administration of DNA linked to killed adenovirus as described in Curiel, 1992, Hum. Gene Ther. 3:147, can also be employed.

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

This invention encompasses compositions, including pharmaceutical compositions, comprising antibodies described herein or made by the methods and having the characteristics described herein. As used herein, compositions comprise one or more pH dependent antibody, and/or one or more polynucleotides comprising sequences encoding one or more these antibodies. These compositions may further comprise suitable excipients, such as pharmaceutically acceptable excipients including buffers, which are well known in the art.

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

- 41 -

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

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

The invention also encompasses scFv of antibodies of this invention. Single chain variable region fragments are made by linking light and/or heavy chain variable
20 regions by using a short linking peptide. Bird et al., 1988, Science 242:423-426. An example of a linking peptide is (GGGGS)₃ (SEQ ID NO:22), which bridges approximately 3.5 nm between the carboxy terminus of one variable region and the amino terminus of the other variable region. Linkers of other sequences have been designed and used. Bird et al., 1988, supra. Linkers should be short, flexible
25 polypeptides and preferably comprised of less than about 20 amino acid residues. Linkers can in turn be modified for additional functions, such as attachment of drugs or attachment to solid supports. The single chain variants can be produced either recombinantly or synthetically. For synthetic production of scFv, an automated synthesizer can be used. For recombinant production of scFv, a suitable plasmid
30 containing polynucleotide that encodes the scFv can be introduced into a suitable host cell, either eukaryotic, such as yeast, plant, insect or mammalian cells, or prokaryotic, such as E. coli. Polynucleotides encoding the scFv of interest can be made by routine

- 42 -

manipulations such as ligation of polynucleotides. The resultant scFv can be isolated using standard protein purification techniques known in the art.

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

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

According to one approach to making bispecific antibodies, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2 and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy chain constant region (CH1), containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are cotransfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

In one approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid

- 43 -

immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. This asymmetric structure, with an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule, facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations. This approach is

5 described in PCT Publ. No. WO 94/04690.

Heteroconjugate antibodies, comprising two covalently joined antibodies, are also within the scope of the invention. Such antibodies have been used to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (PCT Publ. Nos. WO 91/00360 and WO 92/200373; EP 03089).

10 Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents and techniques are well known in the art, and are described in U.S. Patent No. 4,676,980.

Chimeric or hybrid antibodies also may be prepared in vitro using known methods of synthetic protein chemistry, including those involving cross-linking agents. For

15 example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate.

Humanized antibody comprising one or more CDRs of antibodies 5A10 or 7D4 or one or more CDRs derived from antibodies 5A10 or 7D4 can be made, for example,

20 using any methods know in the art. For example, four general steps may be used to humanize a monoclonal antibody. These are: (1) determining the nucleotide and predicted amino acid sequence of the starting antibody light and heavy variable domains; (2) designing the humanized antibody, i.e., deciding which antibody framework region to use during the humanizing process; (3) using the actual humanizing

25 methodologies/techniques; and (4) transfecting and expressing the humanized antibody. See, for example, U.S. Patent Nos. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; and 6,180,370.

In the recombinant humanized antibodies, the Fc portion can be modified to avoid interaction with Fcγ receptor and the complement and immune systems. The

30 techniques for preparation of such antibodies are described in WO 99/58572. For example, the constant region may be engineered to more resemble human constant regions to avoid immune response if the antibody is used in clinical trials and treatments in humans. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,997,867 and 5,866,692.

- 44 -

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

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

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

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an antibody with an N-terminal methionyl
20 residue or the antibody fused to an epitope tag. Other insertional variants of the antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the antibody of an enzyme or a polypeptide which increases the half-life of the antibody in the blood circulation.

Substitution variants have at least one amino acid residue in the antibody
25 molecule removed and a different residue inserted in its place. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 1 under the heading of "conservative substitutions." If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary
30 substitutions", or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

Table 1: Amino Acid Substitutions

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

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties: (1) Non-polar: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) Polar without charge: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) Acidic (negatively charged): Asp, Glu; (4) Basic (positively charged): Lys, Arg; (5) Residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and (6) Aromatic: Trp, Tyr, Phe, His.

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

- 46 -

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

Amino acid modifications can range from changing or modifying one or more amino acids to complete redesign of a region, such as the variable region. Changes in the variable region can alter binding affinity and/or specificity. In some embodiments, no more than one to five conservative amino acid substitutions are made within a CDR domain. In other embodiments, no more than one to three conservative amino acid substitutions are made within a CDR domain. In still other embodiments, the CDR domain is CDR H3 and/or CDR L3.

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

Glycosylation of antibodies is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine, asparagine-X-threonine, and asparagine-X-cysteine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side

- 47 -

chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-acetylgalactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

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

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

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

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

- 48 -

In some embodiments of the invention, the antibody comprises a modified constant region, such as a constant region that is immunologically inert or partially inert, e.g., does not trigger complement mediated lysis, does not stimulate ADCC, or does not activate microglia; or have reduced activities (compared to the unmodified antibody) in any one or more of the following: triggering complement mediated lysis, stimulating ADCC, or activating microglia. Different modifications of the constant region may be used to achieve optimal level and/or combination of effector functions. See, for example, Morgan et al., 1995, *Immunology* 86:319-324; Lund et al., 1996, *J. Immunology* 157:4963-9 157:4963-4969; Idusogie et al., 2000, *J. Immunology* 164:4178-4184; Tao et al., 1989, *J. Immunology* 143: 2595-2601; and Jefferis et al., 1998, *Immunological Reviews* 163:59-76. In some embodiments, the constant region is modified as described in *Eur. J. Immunol.*, 1999, 29:2613-2624; PCT Publ. No. WO99/58572; and/or UK Patent Application No. 9809951.8. In other embodiments, the antibody comprises a human heavy chain IgG2 constant region comprising the following mutations: A330P331 to S330S331 (amino acid numbering with reference to the wild type IgG2 sequence). *Eur. J. Immunol.*, 1999, 29:2613-2624. In still other embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation. In some embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation by mutating the glycosylated amino acid residue or flanking residues that are part of the N-glycosylation recognition sequence in the constant region. For example, N-glycosylation site N297 may be mutated to A, Q, K, or H. See, Tao et al., 1989, *J. Immunology* 143: 2595-2601; and Jefferis et al., 1998, *Immunological Reviews* 163:59-76. In some embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation. The constant region may be aglycosylated for N-linked glycosylation enzymatically (such as removing carbohydrate by enzyme PNGase), or by expression in a glycosylation deficient host cell.

Other antibody modifications include antibodies that have been modified as described in PCT Publ. No. WO 99/58572. These antibodies comprise, in addition to a binding domain directed at the target molecule, an effector domain having an amino acid sequence substantially homologous to all or part of a constant domain of a human immunoglobulin heavy chain. These antibodies are capable of binding the target molecule without triggering significant complement dependent lysis, or cell-mediated destruction of the target. In some embodiments, the effector domain is capable of

- 49 -

specifically binding FcRn and/or FcγRIIb. These are typically based on chimeric domains derived from two or more human immunoglobulin heavy chain C_H2 domains. Antibodies modified in this manner are particularly suitable for use in chronic antibody therapy, to avoid inflammatory and other adverse reactions to conventional antibody therapy.

The invention includes affinity matured embodiments. For example, affinity matured antibodies can be produced by procedures known in the art (Marks et al., 1992, Bio/Technology, 10:779-783; Barbas et al., 1994, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813; Schier et al., 1995, Gene, 169:147-155; Yelton et al., 1995, J. Immunol., 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, J. Immunol., 154(7):3310-9; Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol., 226:889-896; and PCT Publ. No. WO2004/058184).

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

Binding affinity may be determined using Kinexa Biocensor, scintillation proximity assays, ELISA, ORIGEN immunoassay (IGEN), fluorescence quenching, fluorescence

- 50 -

transfer, and/or yeast display. Binding affinity may also be screened using a suitable bioassay.

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

In some embodiments, the library to be screened comprises substitutions in two or more positions, which may be in the same CDR or in two or more CDRs. Thus, the library may comprise substitutions in two or more positions in one CDR. The library may comprise substitution in two or more positions in two or more CDRs. The library may comprise substitution in 3, 4, 5, or more positions, said positions found in two, three, four, five or six CDRs. The substitution may be prepared using low redundancy codons. See, e.g., Table 2 of Balint et al., 1993, Gene 137(1):109-18).

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

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

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

Library scanning mutagenesis also provides a means for characterizing a CDR, in so far as the frequency of clones with improved binding, the same binding, decreased binding or no binding also provide information relating to the importance of each amino acid position for the stability of the antibody-antigen complex. For example, if a position of the CDR retains binding when changed to all 20 amino acids, that position is

- 51 -

identified as a position that is unlikely to be required for antigen binding. Conversely, if a position of CDR retains binding in only a small percentage of substitutions, that position is identified as a position that is important to CDR function. Thus, the library scanning mutagenesis methods generate information regarding positions in the CDRs that can be changed to many different amino acids (including all 20 amino acids), and positions in the CDRs which cannot be changed or which can only be changed to a few amino acids.

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

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

The invention also encompasses fusion proteins comprising one or more fragments or regions from the antibodies or polypeptides of this invention. In one embodiment, a fusion polypeptide is provided that comprises at least 10 contiguous amino acids of a variable light chain region shown in SEQ ID NO: 3 and/or at least 10 amino acids of a variable heavy chain region shown in SEQ ID NOs: 4 or 5. In other embodiments, a fusion polypeptide is provided that comprises at least about 10, at least about 15, at least about 20, at least about 25, or at least about 30 contiguous amino acids of the variable light chain region and/or at least about 10, at least about 15, at least about 20, at least about 25, or at least about 30 contiguous amino acids of the variable heavy chain region. In another embodiment, the fusion polypeptide comprises one or more CDR(s). In still other embodiments, the fusion polypeptide comprises CDR

- 52 -

H3 (VH CDR3) and/or CDR L3 (VL CDR3). For purposes of this invention, a fusion protein contains one or more antibodies and another amino acid sequence to which it is not attached in the native molecule, for example, a heterologous sequence or a homologous sequence from another region. Exemplary heterologous sequences
5 include, but are not limited to a "tag" such as a FLAG tag or a 6His tag. Tags are well known in the art.

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

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

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

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

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

- 53 -

In another aspect, the invention provides polynucleotides encoding any of the antibodies (including antibody fragments) and polypeptides described herein, such as antibodies and polypeptides having impaired effector function. Polynucleotides can be made and expressed by procedures known in the art.

5 In another aspect, the invention provides compositions (such as pharmaceutical compositions) comprising any of the polynucleotides of the invention. In some embodiments, the composition comprises an expression vector comprising a polynucleotide encoding the antibody as described herein. In other embodiment, the composition comprises an expression vector comprising a polynucleotide encoding any
10 of the antibodies or polypeptides described herein. In still other embodiments, the composition comprises either or both of the polynucleotides shown in SEQ ID NO: 23 and SEQ ID NO: 24. Expression vectors, and administration of polynucleotide compositions are further described herein.

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

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

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

- 54 -

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

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

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

- 55 -

number of positions in the reference sequence (i.e. the window size) and multiplying the results by 100 to yield the percentage of sequence identity.

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

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

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

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

- 56 -

have an altered structure or function. Alleles may be identified using standard techniques (such as hybridization, amplification and/or database sequence comparison).

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

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

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

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

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

- 57 -

vectors such as pSA3 and pAT28. These and many other cloning vectors are available from commercial vendors such as BioRad, Strategene, and Invitrogen.

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

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

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

C. Compositions

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

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

- 59 -

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

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

D. Kits

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

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

The kits of this invention are in suitable packaging. Suitable packaging includes, but is not limited to, vials, bottles, jars, flexible packaging (e.g., sealed Mylar or plastic bags), and the like. Also contemplated are packages for use in combination with a specific device, such as an inhaler, nasal administration device (e.g., an atomizer) or an infusion device such as a minipump. A kit may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). The container may also have a sterile access port

- 60 -

(for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). At least one active agent in the composition is a pH dependent antibody. The container (e.g., pre-filled syringe or autoinjector) may further comprise a second pharmaceutically active agent.

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

Mutations and Modifications

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

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

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

 A modification or mutation may also be made in a framework region or constant
30 domain to increase the half-life of a pH dependent. See, e.g., PCT Publ. No. WO 00/09560. A mutation in a framework region or constant domain can also be made to alter the immunogenicity of the antibody, to provide a site for covalent or non-covalent binding to another molecule, or to alter such properties as complement fixation, FcR

- 61 -

binding and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. According to the invention, a single antibody may have mutations in any one or more of the CDRs or framework regions of the variable domain or in the constant domain.

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

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

Once DNA fragments encoding the V_H and V_L segments of the present invention are obtained, these DNA fragments can be further manipulated by standard recombinant DNA techniques, for example to convert the variable region genes to full-length antibody chain genes, to Fab fragment genes, or to a scFv gene. In these manipulations, a V_L - or V_H -encoding DNA fragment is operatively linked to another DNA fragment encoding another protein, such as an antibody constant region or a flexible linker. The term "operatively linked", as used in this context, is intended to mean that the two DNA fragments are joined such that the amino acid sequences encoded by the two DNA fragments remain in-frame.

- 62 -

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

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

To create a scFv gene, the V_H- and V_L-encoding DNA fragments are operatively linked to another fragment encoding a flexible linker, e.g., encoding the amino acid sequence (Gly₄-Ser)₃, such that the V_H and V_L sequences can be expressed as a contiguous single-chain protein, with the V_L and V_H regions joined by the flexible linker (See e.g., Bird et al., 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554. The single chain

- 63 -

antibody may be monovalent, if only a single V_H and V_L are used, bivalent, if two V_H and V_L are used, or polyvalent, if more than two V_H and V_L are used. Bispecific or polyvalent antibodies may be generated that bind specifically to antigen and to another molecule.

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

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

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

Generation of antigen-specific antibodies

- 64 -

DNA of the heavy and light chains of representative antibodies of the present invention, 5L1721H23_6L3 and 5L1721H23_6L3H3, were deposited in the American Type Culture Collection (ATCC) (under the terms of the Budapest Treaty) on December 22, 2009, and were assigned the accession numbers in Table 2. All restrictions on the availability to the public of the plasmids so deposited will be irrevocably removed upon the issuance of a patent from the specification of the present invention. The antibody references for the heavy and light chains of 5L1721H23_6L3 are UC-H5H23 and UC-H5L1721-6L3, respectively. The antibody references for the heavy and light chains of 5L1721H23_6L3H3 are UC-H5H23-6H3 and UC-H5L1721-6L3, respectively.

Table 2

<u>Antibody Reference</u>	<u>ATCC Accession No.</u>
UC-H5H23	PTA-10547
UC-H5H23-6H3	PTA-10548
UC-H5L1721-6L3	PTA-10549

Examples

Example 1: Modeling antibody pH dependent binding to PCSK9 antigen

Computer modeling was used to predict whether an antibody with pH dependent antigen binding could impact antibody half life the duration of the lowering of the PCSK9 serum concentration. For the purpose of this modeling the following assumptions were made: 1 uM dose of antibody in blood; 21 day (non pH dependent) antibody half-life; a simulation run duration of 100 days; for the pH dependent antibody, a $K_{on} = 1e5/M/s$, a $K_{off} @ \text{neutral pH} = K_D * K_{on}$, the pH dependent binding is modeled as an increase in K_{off} in the acidic endosomes; and K_{off} at acidic pH = $R * K_{off}$ at neutral pH.

The time rates of change of the species in the model are specified in terms of model parameters by the differential equations below. Generally, the model is allowed to proceed with antibody levels set to zero until it reaches a steady state; at that time, a bolus of antibody is simulated by resetting $[mAb]$ from zero to a level reflective of the dose, and then allowing the model described below to proceed.

$$\begin{aligned}
 [P] = & k_{P,create} - k_{activeuptake}[P] - k_{protein,on}[LDLR][P] + k_{P,off}[P \cdot LDLR] - k_{protein,on}[LDL \cdot LDLR][P] \\
 & + k_{P,off}[LDL \cdot P \cdot LDLR] - 2k_{on,neutral}[mAb][P] + k_{off,neutral}[mAb \cdot P] \\
 & - k_{on,neutral}[mAb \cdot P][P] + 2k_{off,neutral}[mAb \cdot P \cdot P] - \frac{k_{endouptake}[P] - k_{endouptake}A[P]_{early}}{V}
 \end{aligned}$$

- 65 -

$$[LDL] = k_{L,create} - k_{L,clear}[LDL] - k_{protein,on}[LDLR][LDL] + k_{L,off}[LDL \cdot LDLR] \\ - k_{protein,on}[P \cdot LDLR][LDL] + k_{L,off}[LDL \cdot P \cdot LDLR]$$

$$[LDLR] = k_{R,create} - k_{R,clear}[LDLR] - k_{protein,on}[LDLR][LDL] + k_{L,off}[LDL \cdot LDLR] - k_{protein,on}[LDLR][P] \\ + k_{P,off}[P \cdot LDLR] + k_{recycle}[LDL \cdot LDLR]_{in}$$

$$5 \quad [mAb] = -2k_{on,neutral}[mAb][P] + k_{off,neutral}[mAb \cdot P] - \frac{k_{endouptake}[mAb] - k_{endouptake}A[mAb]_{early}}{V} \\ + \frac{k_{endouptake}(1-A)F[mAb]_{late}}{V} + \frac{\alpha k_{endouptake}(1-A)F[mAb]_{active}}{V}$$

$$[mAb \cdot P] = 2k_{on,neutral}[mAb][P] - k_{off,neutral}[mAb \cdot P] - k_{on,neutral}[mAb \cdot P][P] + 2k_{off,neutral}[mAb \cdot P \cdot P] \\ - \frac{k_{endouptake}[mAb \cdot P] - k_{endouptake}A[mAb \cdot P]_{early}}{V} + \frac{k_{endouptake}(1-A)F[mAb \cdot P]_{late}}{V} \\ - k_{activeuptake}[mAb \cdot P]$$

$$[mAb \cdot P \cdot P] = k_{on,neutral}[mAb \cdot P][P] - 2k_{off,neutral}[mAb \cdot P \cdot P] \\ - \frac{k_{endouptake}[mAb \cdot P \cdot P] - k_{endouptake}A[mAb \cdot P \cdot P]_{early}}{V} + \frac{k_{endouptake}(1-A)F[mAb \cdot P \cdot P]_{late}}{V} \\ - 2k_{activeuptake}[mAb \cdot P \cdot P]$$

$$10 \quad [LDL \cdot LDLR] = k_{protein,on}[LDLR][LDL] - k_{L,off}[LDL \cdot LDLR] - k_{protein,on}[LDL \cdot LDLR][P] \\ + k_{P,off}[LDL \cdot P \cdot LDLR] - k_{internalize}[LDL \cdot LDLR]$$

$$[P \cdot LDLR] = k_{protein,on}[LDLR][P] - k_{P,off}[P \cdot LDLR] - k_{protein,on}[P \cdot LDLR][LDL] \\ + k_{L,off}[LDL \cdot P \cdot LDLR] - k_{internalize}[P \cdot LDLR]$$

$$[LDL \cdot P \cdot LDLR] = k_{protein,on}[LDL \cdot LDLR][P] - k_{P,off}[LDL \cdot P \cdot LDLR] + k_{protein,on}[P \cdot LDLR][LDL] \\ - k_{L,off}[LDL \cdot P \cdot LDLR] - k_{internalize}[LDL \cdot P \cdot LDLR]$$

15

$$[P \cdot LDLR]_{in}' = k_{internalize}[P \cdot LDLR] - k_{recycle}[P \cdot LDLR]_{in}$$

$$[LDL \cdot LDLR]_{in}' = k_{internalize}[LDL \cdot LDLR] - k_{recycle}[LDL \cdot LDLR]_{in}$$

20

$$[LDL \cdot P \cdot LDLR]_{in}' = k_{internalize}[LDL \cdot P \cdot LDLR] - k_{recycle}[LDL \cdot P \cdot LDLR]_{in}$$

$$[mAb]_{early}' = \frac{k_{endouptake}[mAb] - k_{endouptake}A[mAb]_{early}}{V_{early}} - 2k_{on,neutral}[mAb]_{early}[P]_{early} \\ + k_{off,neutral}[mAb \cdot P]_{early} - \frac{k_{endouptake}(1-A)[mAb]_{early}}{V_{early}}$$

- 66 -

$$[P]_{early}' = \frac{k_{endouptake}[P] - k_{endouptake}A[P]_{early}}{V_{early}} - 2k_{on,neutral}[mAb]_{early}[P]_{early} + k_{off,neutral}[mAb \cdot P]_{early} \\ - k_{on,neutral}[mAb \cdot P]_{early}[P]_{early} + 2k_{off,neutral}[mAb \cdot P \cdot P]_{early} - \frac{k_{endouptake}(1-A)[P]_{early}}{V_{early}}$$

$$[mAb \cdot P]_{early}' = \frac{k_{endouptake}[mAb \cdot P] - k_{endouptake}A[mAb \cdot P]_{early}}{V_{early}} + 2k_{on,neutral}[mAb]_{early}[P]_{early} \\ - k_{off,neutral}[mAb \cdot P]_{early} - k_{on,neutral}[mAb \cdot P]_{early}[P]_{early} + 2k_{off,neutral}[mAb \cdot P \cdot P]_{early} \\ - \frac{k_{endouptake}(1-A)[mAb \cdot P]_{early}}{V_{early}}$$

5

$$[mAb \cdot P \cdot P]_{early}' = \frac{k_{endouptake}[mAb \cdot P \cdot P] - k_{endouptake}A[mAb \cdot P \cdot P]_{early}}{V_{early}} + k_{on,neutral}[mAb \cdot P]_{early}[P]_{early} \\ - 2k_{off,neutral}[mAb \cdot P \cdot P]_{early} - \frac{k_{endouptake}(1-A)[mAb \cdot P \cdot P]_{early}}{V_{early}}$$

$$[mAb]_{late}' = \frac{k_{endouptake}(1-A)[mAb]_{early}}{V_{late}} - 2k_{on,acidic}[mAb]_{late}[P]_{late} + k_{off,acidic}[mAb \cdot P]_{late} \\ - \frac{k_{endouptake}(1-A)(1-F)[mAb]_{late}}{V_{late}}$$

$$[P]_{late}' = \frac{k_{endouptake}(1-A)[P]_{early}}{V_{late}} - 2k_{on,acidic}[mAb]_{late}[P]_{late} + k_{off,acidic}[mAb \cdot P]_{late} - k_{on,acidic}[mAb \cdot P]_{late}[P]_{late} \\ + 2k_{off,acidic}[mAb \cdot P \cdot P]_{late} - \frac{k_{endouptake}(1-A)[P]_{late}}{V_{late}}$$

$$[mAb \cdot P]_{late}' = \frac{k_{endouptake}(1-A)[mAb \cdot P]_{early}}{V_{late}} + 2k_{on,acidic}[mAb]_{late}[P]_{late} - k_{off,acidic}[mAb \cdot P]_{late} \\ - k_{on,acidic}[mAb \cdot P]_{late}[P]_{late} + 2k_{off,acidic}[mAb \cdot P \cdot P]_{late} - \frac{k_{endouptake}(1-A)F[mAb \cdot P]_{late}}{V_{late}} \\ - \frac{k_{endouptake}(1-A)(1-F)[mAb \cdot P]_{late}}{V_{late}}$$

10

$$[mAb \cdot P \cdot P]_{late}' = \frac{k_{endouptake}(1-A)[mAb \cdot P \cdot P]_{early}}{V_{late}} + k_{on,acidic}[mAb \cdot P]_{late}[P]_{late} - 2k_{off,acidic}[mAb \cdot P \cdot P]_{late} \\ - \frac{k_{endouptake}(1-A)F[mAb \cdot P \cdot P]_{late}}{V_{late}} - \frac{k_{endouptake}(1-A)(1-F)[mAb \cdot P \cdot P]_{late}}{V_{late}}$$

$$[mAb]_{active}' = -2k_{on,acidic}[mAb]_{active}[P]_{active} + k_{off,acidic}[mAb \cdot P]_{active} - \alpha k_{endouptake}(1-A)(1-F)[mAb]_{active} \\ - \frac{\alpha k_{endouptake}(1-A)F[mAb]_{active}}{V_{active}}$$

$$[P]_{active}' = -2k_{on,acidic}[mAb]_{active}[P]_{active} + k_{off,acidic}[mAb \cdot P]_{active} - k_{on,acidic}[mAb \cdot P]_{active}[P]_{active} \\ + 2k_{off,acidic}[mAb \cdot P \cdot P]_{active} - \alpha k_{endouptake}(1-A)[P]_{active}$$

$$[mAb \cdot P]_{active}' = k_{activeuptake}[mAb \cdot P] \frac{V}{V_{active}} + 2k_{on,acidic}[mAb]_{active}[P]_{active} - k_{off,acidic}[mAb \cdot P]_{active} \\ - k_{on,acidic}[mAb \cdot P]_{active}[P]_{active} + 2k_{off,acidic}[mAb \cdot P \cdot P]_{active} - \alpha k_{endouptake}(1-A)[mAb \cdot P]_{active}$$

- 67 -

$$[mAb \cdot P \cdot P]_{active}' = 2k_{activeuptake}[mAb \cdot P \cdot P] \frac{V}{V_{active}} + k_{on,acidic}[mAb \cdot P]_{active}[P]_{active} - 2k_{off,acidic}[mAb \cdot P \cdot P]_{active} - \alpha k_{endouptake}(1-A)[mAb \cdot P \cdot P]_{active}$$

The parameters used in the model are described below in Table 3. In some cases, parameters are derived from other physiologically-relevant or measured quantities;

5 these are indicated in the table as well.

Table 3 (N) = non-pH dependent mAb; (AS) = pH dependent mAb

Parameter	Description	Value
V	Blood volume	2 mL
V_{early}	Early endosome volume	0.06 mL
V_{late}	Late endosome volume	0.06 mL
V_{active}	Active uptake endosome volume	0.3 mL
$k_{R,create}$	Rate of LDLR synthesis	0.1 nM/hr
$k_{P,create}$	Rate of PCSK9 synthesis	1.714 nM/hr
$k_{L,create}$	Rate of LDL synthesis	10.44 nM/hr
$k_{activeuptake}$	First order rate of active PCSK9 uptake	$\ln(2)/t_{activeuptake}$
$t_{activeuptake}$	Time scale for active PCSK9 uptake	1 hr
$k_{R,clear}$	First order clearance rate for LDLR	0.1872 hr^{-1}
$k_{L,clear}$	First order clearance rate for LDL	0.018054 hr^{-1}
$k_{protein,on}$	Protein-protein association rate	$100000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$k_{L,off}$	LDL/LDLR dissociation rate constant	$k_{protein,on} K_{d,L}$
$K_{d,L}$	LDL/LDLR affinity	10 nM
$k_{P,off}$	PCSK9/LDLR dissociation rate constant	$k_{protein,on} K_{d,P}$
$K_{d,P}$	PCSK9/LDLR affinity	170 nM
$k_{internalize}$	First order LDLR internalization rate	$\ln(2)/t_{internalize}$
$t_{internalize}$	Time scale for LDLR internalization	5 min
$k_{recycle}$	First order LDLR recycling rate	$\ln(2)/t_{recycle}$
$t_{recycle}$	Time scale for LDLR recycling	10 min
$k_{on,neutral}$	Antibody/PCSK9 association rate (pH 7.4)	$1.01 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (N)
		$6.37 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (AS)
$k_{off,neutral}$	Antibody/PCSK9 dissociation rate (pH 7.4)	$4.85 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (N)
		$5.16 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (AS)
$k_{on,acidic}$	Antibody/PCSK9 association rate (pH 5.5)	$3.73 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (N)
		$1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (AS)
$k_{off,acidic}$	Antibody/PCSK9 dissociation rate (pH 5.5)	$1.94 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (N)
		0.0187 s^{-1} (AS)
$k_{endouptake}$	Volume rate of uptake into early endosomes	8 $\mu\text{L}/\text{min}$
A	Automatic recycling fraction	0.7 (dimensionless)

- 68 -

F	FcRn-mediated antibody recycling efficiency	0.972 (dimensionless)
α	Increase in active endosome processing time (compared to fluid phase endosomes)	4 (dimensionless)

One depiction of the modeling is shown in Figure 1. Increasing the K_D ratio of endosomal pH (i.e., pH 5.5 or 6.0)/ physiologic pH 7.4 from 1 to 2 resulted in an increase in antibody concentration over time, which was correlated with the value of the K_D ratio. When the K_D ratio was changed, or k_{off} or k_{on} , the antigen free ligand concentration was changed (Figure 2) as well as antibody concentration (Figure 3) in correlation with the increase K_D ratio (Figure 2), increased k_{off} (Figure 3A) and decreased k_{on} (Figure 3B). These results were not dependent upon designating whether endosomal pH was 5.5 or 6.0.

A heatmap display (Figure 4) was constructed for a general model of antibodies with pH dependent binding, effectively showing how many days longer the antibody with pH dependent binding should decrease the serum concentration of antigen beyond that observed for a non-pH dependent antibody. Knockdown days are defined by integral of: $1-(C_{serum}(t))/(C_{serum}(t=0))$ from day 0 to day 100, e.g., a 100% reduction in serum concentration for N days followed by a return to pretreatment level would correspond to N knockdown days. The heat maps show the increase in knockdown days for the pH dependent antibodies, as compared to the control antibodies, based upon the K_D at neutral pH and also the K_D ratio (R). Effects are seen throughout all K_D values modeled, particularly between 0.01 and 100 nM, and more particularly between K_D of 0.1 and 10 nM. Changes in certain parameters, e.g., dose size, antibody kinetics, duration of simulation, or other quantities will lead to some differences in the values shown on the heat maps.

Modeling predictions for the performance of PCSK9 antibodies, with or without pH dependent binding, correlated well with actual experimental results. In Figure 5A, the total antibody concentration over time after administering antibody 5A10, which has no pH dependent binding and a K_D ratio of 1.1, is shown. Counterpart LDL levels are shown in Figure 5B. In Figure 6A, the total antibody concentration over time after administering antibody 5L1721H23_6L3H3, which has pH dependent binding and a K_D ratio of 14.4, is shown. Counterpart LDL levels are also shown in Figure 6B. For these models and experiments in Figures 5 and 6, a pH of 5.5 was assumed and the

experimental K_D values for the antibodies were calculated at pH 5.5. The pH dependent binding antibody demonstrated prolonged total antibody concentration and a prolonged inhibition of LDL levels as compared to 5A10. Further discussion of the general model for antibodies with pH dependent binding is shown in Example 4.

5

Example 2: Generating and Screening anti-PCSK9 Antibodies with pH dependent PCSK9 binding

Histidine scan mutagenesis was conducted for all CDRs of monoclonal antibody h5A10 (also known as 5A10 hu frame). This antibody originates from mouse
10 monoclonal antibody 5A10 (also known as 5A10.B8), but has human framework regions. The sequence of the h5A10 antibody used as the starting template is shown below (CDRs are in bold font):

Variable Light chain:

15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK**ASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGV**
PSRFGSGSGSGTDFTFTISSLPEDVATYYC**QQRYS**TPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:
1)

Variable Heavy chain:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV**SCKASGYTFTSYMH**WVRQAPGGGLEWMGEIN**PSGG**
20 **RTNYNEKF**KSRVTMTRDTSTSTVYME**LSLR**SEDTAVYYC**ARERPLYAMDYWGQGT**T
VTVSS (SEQ ID NO: 2)

The antibody h5A10 was cloned into a bacterial expression vector, which allows the expression of Fabs in the periplasm of E. coli. Using primers, every CDR position
25 was mutated to histidine, resulting in 58 single histidine mutants of the h5A10 antibody.

Antibodies with these single histidine mutants were expressed in the periplasm of E. coli after induction with IPTG and purified using a histidine tag on the C-terminus of the CH1. The affinities of the purified Fabs were measured at pH 5.5 and 7.4 with Biacore. Mutations influencing the K_D ratio of pH 5.5/pH 7.4 were found in four different
30 CDR's (L1, L2, H2 & H3). The pH dependent change on the K_D ranged between minimally decreased and significantly decreased.

Mutations from three CDRs (L1, L2 & H2) increased the K_D -ratio of pH 5.5/pH 7.4 without destroying the affinity at pH 7.4, and the antibodies combining the CDRs containing these mutations were generated. For h5A10 and all mutants, the heavy

- 70 -

chain CDR1 (H1) sequence is GYTFTSYMH (SEQ ID NO: 6). For 5A10, single, double, and triple mutants, and 5L1721H23_6H3, the light chain CDR3 (L3), is QQRYSTPRT (SEQ ID NO: 27). For the other affinity matured mutants and L1L3-based mutants, L3 is QQRYSLWRT (SEQ ID NO: 12). The CDR sequences of the antibodies containing these various combinations of mutations are shown in Table 4 below. Sequence number identifiers are provided in parentheses.

Table 4

	L1	L2	H2	H3
h 5A10	KASQDVSTAVA(13)	SASYRYT(17)	EINPSGGRTNYNEKFKS(19)	ERPLYAMDY(8)
Single mutants:				
5L-6	KASQDHSTAVA (14)			
5L1-7	KASQDVHTAVA(10)			
5L2-1		HASYRYT(11)		
5L2-4		SASHRYT(18)		
5H2-3			EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	
5H3-5				ERPLHAMDY(21)
Double mutants:				
5L17 21	KASQDVHTAVA(10)	HASYRYT(11)		
5L17 24	KASQDVHTAVA(10)	SASHRYT(18)		
5L17H23	KASQDVHTAVA(10)		EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	
5L21 24		HASHRYT(19)		
5L21 H23		HASYRYT(11)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	
5L24 H23		SASHRYT(18)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	
Triple mutants:				
5L17 21 H23	KASQDVHTAVA(10)	HASYRYT(11)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	
5L17 24 H23	KASQDVHTAVA(10)	SASHRYT(18)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	
5L1724H35	KASQDVHTAVA(10)	SASHRYT(18)		ERPLHAMDY(21)
Affinity matured mutants:				
5L1721H23_6H3	KASQDVHTAVA(10)	HASYRYT(11)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	ERPLYASDL(9)
5L1721H23_6L3	KASQDVHTAVA(10)	HASYRYT(11)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	
5L1724H23_6L3	KASQDVHTAVA(10)	SASHRYT(18)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	

- 71 -

	L1	L2	H2	H3
5L1721H23_6L3H3	KASQDVHTAVA(10)	HASYRYT(11)	EIHPSSGGRNTNYNEKFKS(7)	ERPLYASDL(9)
5L1724H23_6L3H3	KASQDVHTAVA(10)	SASHRYT(18)	EIHPSSGGRNTNYNEKFKS(7)	ERPLYASDL(9)
L1L3-based mutants:				
L1L3	RASQGISSALA(15)	SASYRYT(17)	EISPFSSGGRNTNYNEKFKS(20)	ERPLYASDL(9)
6L1721H23	RASQGIHSALA(16)	HASYRYT(11)	EIHPSSGGRNTNYNEKFKS(7)	
6L1721	RASQGIHSALA(16)	HASYRYT(11)		
6L21H2335		HASYRYT(11)	EIHPSSGGRNTNYNEKFKS(7)	

No changes were made in the framework sequences for these antibodies as compared to 5A10.B8. For example, the sequences for the variable heavy chains of 5L1721H23_6L3 and 5L1721H23_6L3H3 are provided below. The same variable light chain was used in each of these antibodies and is also provided below. CDRs are highlighted in bold.

Variable light chain of 5L1721H23_6L3 and 5L1721H23_6L3H3:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK**KASQDVHTAVAWY**QQKPGKAPKLLIY**HASYRYT**GV
 10 PSRFGSGSGSDFTFTISSLPEDATYYC**QQRYS**LTWRTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 3)

Variable heavy chain 5L1721H23_6L3:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV**SCKASGYTFTSYMH**WVRQAPGQGLEWMGE**IHPSSG**
 15 **RTNYNEKFKSR**VTMTRDTSTSTVYME**SSLR**SEDTAVYYCAR**ERPLYAM**DY
 WGQGT

Variable heavy chain 5L1721H23_6L3H3:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV**SCKASGYTFTSYMH**WVRQAPGQGLEWMGE**IHPSSG**
 20 **RTNYNEKFKSR**VTMTRDTSTSTVYME**SSLR**SEDTAVYYCAR**ERPLYAS**DL
 WGQGT

Variable light chain (kappa) of 5L1721H23_6L3 and 5L1721H23_6L3H3

- 72 -

gatatccagatgacacagtcctccctgtctgcctctgtggcgaccggtcaccatcacctgcaaggcctctcagg
 atgtgcatactgctgtagcctggatcagcagaagccaggcaaagcccaaaactgctgatctacatgcatcctaccgct
 aactgggtgccatcacgcttcagtggcagtggtctgttacagatttcaccttcaccattagcagcctgcaaccagaaga
 tattgccacttattactgccagcaacgttatagtctgtggcgacggtcggtaaggcaccaagctggagatcaaa (SEQ
 5 ID NO: 23)

Variable heavy chain of 5L1721H23_6L3H3

cagggtgcagctggtgcagctcgtggtgctgaggtgaagaagcctggcgcttccgtgaagggttctgcaaagcatctggttaca
 cctttaccagctactatgactggtggtgcgccaagcccctggtaaggcctggagtggtggcgagattcatcctagcg
 10 gcggtcgtactaactacaatgagaagttcaagagccgctgactatgactcgcgatacctccaccagcactgtctacatgg
 aactgagctctctgcgtctgaggacactgctgtgtattactgtgcccgcgagcgccccctgtatgctagcgacctgtgggg
 ccagggtaccacggtcacccgtctcctca (SEQ ID NO: 24)

These antibodies were expressed and purified for determination of their K_D at 7.4
 15 and their K_D ratio of pH5.5/pH 7.4, as measured on a surface plasmon resonance
 Biacore 3000 biosensor equipped with a research-grade sensor chip using HBS-EP
 running buffer (Biacore AB, Uppsala, Sweden – now GE Healthcare). Rabbit polyclonal
 anti-Ms IgGs were amine-coupled at saturating levels onto the chip using a standard N-
 hydroxysuccinimide/ ethyldimethylaminopropyl carbodiimide (NHS/EDC) chemistry. The
 20 buffer was switched to HBS-EP + 1 mg/mL BSA + 1 mg/mL CM-dextran. Full-length
 PCSK9 IgGs were diluted to about 15 μ g/mL and captured for 1 min at 5 μ L/min to give
 levels of about 500RU per flow cell, leaving one blank to serve as a reference channel.
 3.73-302 nM hPCSK9 or 2.54-206 nM mPCSK9 were injected as a 5-membered 3-fold
 series for 1 min at 100 μ L/min. Dissociation was monitored for 5 min. The chip was
 25 regenerated after the last injection of each titration with two 30 sec pulses of 100 mM
 phosphoric acid. Buffer cycles provided blanks for double-referencing the data, which
 were then fit globally to a simple binding model using Biaevaluation software v.4.1.
 Affinities were deduced from the quotient of the kinetic rate constants ($K_D = k_{off}/k_{on}$).
 The results for affinity to human PCSK9 are shown in Table 5, and the results for affinity
 30 to mouse PCSK9 are shown in Table 6. These data show that antibodies can be
 designed and selected to have higher affinity for human or mouse PCSK9 at pH 7.4,
 and a lower affinity at pH 5.5.

- 73 -

Table 5. Binding affinities for the anti-PCSK9 antibodies binding to human PCSK9 at pH 7.4 and 5.5.

	huPCS K9 pH 7.4				huPCS K9 pH 5.5				pH 5.5/7.4
	kon (1/Ms)	Koff (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	kon (1/Ms)	Koff (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	KD
6L1721	3.29E+04	7.08E-05	880	2.2	1.66E+05	8.40E-04	1059	5.1	2.3
5A10.B8	4.38E+04	1.04E-04	1080	2.4	1.31E+05	3.91E-04	1020	3.0	1.3
5L1721H23_6L3H3	4.42E+04	1.72E-04	934	3.9	8.28E+04	4.80E-03	1430	58	14.9
6L1721H23	5.02E+04	2.01E-04	645	4.0	1.10E+05	2.61E-03	1140	24	6
5L1721H23_6L3	3.09E+04	2.14E-04	974	6.9	6.45E+04	0.0166	1320	257	37.2
5L1721H23_6H3	3.74E+04	2.73E-04	461	7.3	1.41E+05	7.72E-03	398	55	7.5
5L1721H23	3.17E+04	3.99E-04	990	13	1.24E+05	0.0179	1030	144	11.1
5L1724H23_6L3H3	2.23E+04	3.42E-04	1020	15	9.55E+04	7.89E-03	1500	83	5.5
5L1724H23_6L3	3.59E+04	7.90E-04	910	22	7.54E+04	0.0407	1050	540	24.5
6L21H2335	5.81E+04	7.33E-03	892	126	6.55E+05	2.38E-01	624	363	2.9
5L1724H23	-	-	20	-	2.03E+05	7.93E-03	114	39	
5L1724H35	-	-	40	-	-	-	0	-	

5

Table 6. Binding affinities for the anti-PCSK9 antibodies binding to mouse PCSK9 at pH 7.4 and 5.5.

	msPCK9 pH 7.4				msPCK9 pH 5.5				huPCK9 pH 5.5/7.4
	kon (1/Ms)	Koff (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	kon (1/Ms)	Koff (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	KD
6L1721	8.80E+04	2.28E-04	1260	2.6	3.38E+05	1.77E-03	1120	5.2	2.0
5A10_WT	1.01E+05	4.85E-04	1410	4.8	3.73E+05	1.94E-03	1050	5.2	1.1
5L1721H23_6L3H3	6.37E+04	5.16E-04	1630	8.1	1.60E+05	0.0187	1420	117	14.4
6L1721H23	6.48E+04	4.69E-04	1230	7.2	2.04E+05	7.29E-03	1220	36	5.0
5L1721H23_6L3	4.75E+04	6.76E-04	1600	14	1.05E+05	0.0428	1360	408	29.1
5L1721H23_6H3	1.13E+05	8.99E-04	615	8.0	3.07E+05	0.0341	460	111	13.9
5L1721H23	6.12E+04	1.41E-03	1380	23	1.02E+05	0.0588	1100	576	25.0
5L1724H23_6L3H3	6.31E+04	8.27E-04	1690	13	2.11E+05	0.0263	1520	125	9.6
5L1724H23_6L3	5.31E+04	2.18E-03	1440	41	1.60E+05	0.121	1100	756	18.4
6L21H2335	8.99E+04	1.72E-02	1340	191	5.26E+05	0.237	502	451	2.4
5L1724H23	-	-	40	-	2.73E+05	2.02E-02	91	74	

- 74 -

	msPCK9 pH 7.4				msPCK9 pH 5.5				huPCK9 pH 5.5/7.4
	kon (1/Ms)	Koff (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	kon (1/Ms)	Koff (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	KD
5L1724H35	4.43E+04	1.53E-03	164	35	-	-	0	-	

Affinity and kinetic parameters for PCSK9 antibodies h5A10 and 5L1721H23_6L3H3 as well as PCSK9 antibody H1M300N (see US2010/0166768, e.g., at Table 7). All experiments were performed on a Biacore 2000 biosensor.

5 An anti-human Fc sensor chip was prepared by activating all flow cells of a Biacore CM4 sensor chip with a 1:1 (v/v) mixture of 400 mM EDC and 100 mM NHS for 7 minutes, at a flow rate of 10 μ L/min. An anti-human Fc reagent (Goat F(AB')₂ Fragment to Human IgG Fc, Cappel Catalog #: 55053) was diluted to 60 μ g/mL in 10 mM Sodium Acetate pH 5.0 and injected on all flow cells for 7 minutes at 20 μ L/min. All
10 flow cells were blocked with 100 mM ethylenediamine in 150 mM Borate buffer pH 8.5 for 7 minutes at 10 μ L/min.

The kinetics assay was run using a kinetic titration methodology as described in Karlsson et al., Anal. Biochem 349, 136-147 (2006).

The same antibody (e.g., 5L1721H23_6L3H3) was captured onto downstream
15 flow cells (flow cells 2, 3 and 4) at 2 μ g/mL at a flow rate of 10 μ L/min for 30 seconds, 60 seconds and 120 seconds for flow cells 2, 3 and 4 respectively. Flow cell 1 was used as a reference surface. Following capture of antibodies, PCSK9 was injected at 30 μ L/min on all flow cells in a series of injections from low to high concentration. The top concentration was 200 nM PCSK9 and the dilution factor was 3-fold. Each PCSK9
20 injection was two-minutes, the dissociation time after the 200 nM PCSK9 injection was 20 minutes. A similar set of injections was performed with running buffer in place of PCSK9 for double-referencing purposes (double-referencing as described in Myszk, J. Mol. Recognit 12, 279-284, 1999). After each analysis cycle all flow cells were
25 regenerated with three 30-second injections of 75 mM Phosphoric Acid. The sensorgrams from flow cells 2 and 3 for a given PCSK9/antibody pair were fit globally to a simple 1:1 Langmuir with mass transport binding model.

The experiments were performed at pH 6.0 and 7.4 using sample and running buffers of 10 mM Sodium Phosphate, 150 mM Sodium Chloride, 0.05% Tween-20, pH 6 and 10 mM Sodium Phosphate, 150 mM Sodium Chloride, 0.05% Tween-20, pH 7.4,
30 respectively.

- 75 -

Table 7. pH dependent binding

Antibody	pH 6.0 (Sodium Phosphate)				pH 7.4 (Sodium Phosphate)				ratios	
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	K_D (pM)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	K_D (pM)	K_D , pH 6/ K_D , pH 7.4	k_d , pH 6/ k_d , pH 7.4
5A10_WT	3.31E+05	< 6E-5	< 193	< 181	2.41E+05	< 6E-05	< 193	< 249		
5L1721H_23_6L3H3	3.07E+05	2.86E-03	4.0	9316	2.42E+05	1.74E-04	66.4	719	13.0	16.4
H1M300N	4.27E+05	3.21E-04	36.0	752	1.67E+05	6.92E-05	166.9	414	1.8	4.6

5 Example 3: PH dependent PCSK9 binding Antibodies Have an Extended Pharmacodynamic Effect on Lowering Cholesterol

A. pH dependent PCSK9 binding antagonist antibodies lower serum cholesterol for an extended duration in mice

10 To determine if pH dependent PCSK9 binding antagonist antibodies can lower cholesterol levels in vivo for an extended duration as compared to non-pH dependent antibodies, the time course effects of acid sensitive antibodies 5L1721H23_6H3 and 5L1721H23_6L3H3 and non-acid sensitive antibodies h5A10 (only dosed at 10mg/kg) and 5A10.B8 were tested on serum cholesterol when injected at 1, 3, or 10 mg/kg into

15 mice. All four antibodies have similar binding affinities of 5-14 nM at neutral pH (PH 7.4) to mouse PCSK9. Antibodies 5L1721H23_6H3 and 5L1721H23_6L3H3 have reduced affinities of 117nM and 408nM, respectively, at pH 5.5, whereas h5A10 and 5A10.B8 have K_D at pH 5.5 similar to that of 7.4 (5.2nM). Male C57/bl6 mice, 6 to 7 weeks old, were kept on a 12 hr light/dark cycle, bled to collect approximately 70 μ l serum on day -

20 7. Antagonist PCSK9 antibodies and a control isotype matching monoclonal antibody that does not bind to any known mammalian proteins were injected IV into male 7 week old C57/bl6 mice and serum samples were collected on days 5, 12, 19, 26, 61, and 75 post-injection. All serum samples were analyzed for total cholesterol, triglyceride, HDL cholesterol on the Ace Alera instrument (Alfa Wassermann, West Caldwell, NJ) and LDL

25 cholesterol levels were calculated using Friedewald equation. Figure 7 shows a rapid and dose-dependent decrease in total cholesterol levels following injection of a PCSK9 antagonist antibody. LDL cholesterol levels in mice were too low to be reliably measured and calculated. At 10 mg/kg dose, all four antibodies lowered HDL-cholesterol by 35-

- 76 -

40% on days 5 and 12, while 5L1721H23_6H3 and 5L1721H23_6L3H3 injected animals did not recover until day 61, h5A10 and 5A10.B8 injected animals returned to baseline levels on days 26 and 33, respectively.

5 B. pH dependent PCSK9 binding antibodies have an extended half-life in mice

Serum concentrations of antibody were determined in the same study described in example b to determine whether PH sensitive anti-PCSK9 antibodies resulted in extended antibody half-life. Normal anti-PCSK9 antibodies such as h5A10 and 5A10.B6 have dose-dependent shorter half life compared to antibodies that binds to other soluble
10 antigens, due to PCSK9-mediated degradation of antibody/antigen complex. As shown in Figure 8A, the pH dependent binding property reduced antibody degradation and extended the half life of anti-PCSK9 antibodies 5L1721H23_6H3 and 5L1721H23_6L3H3. To further demonstrate that the prolonged PK of 5L1721H23_6H3 and 5L1721H23_6L3H3 was a result of diminished PCSK9-mediated clearance of
15 antibodies, a similar time course study was conducted in PCSK9 knockout mice. The differences in serum antibody concentrations and the rates of reduction between the PH sensitive and non-sensitive antibodies were insignificant until 3 mg/kg human PCSK9 was injected in the mice. Following this injection, the non-PH sensitive PCSK9 antibodies demonstrated increased degradation as compared to the PH sensitive
20 antibodies and the negative control antibody (Figure 8B). These results indicate that the observed decreased degradation of pH dependent PCSK9 binding PCSK9 antibodies results from dissociation of the antibody from PCSK9 and, therefore, rescue of the antibody from PCSK9-mediated degradation.

25 C. pH sensitive PCSK9 antagonist antibodies lower serum cholesterol for an extended duration in monkeys

Figure 9B illustrates the effect of PH sensitive anti-PCSK9 antagonist antibodies 5L1721H23_6H3 and 5L1721H23_6L3H3 and non sensitive anti-PCSK9 antibody L1L3 on serum LDL-cholesterol levels of cynomolgus as percent control. Antibodies
30 (1.5mg/kg of each) were administered on day 0 to female cynomolgus monkeys via i.v. bolus injection. The LDL-cholesterol was reduced to 50% of baseline by day in all three antibody-treated groups. While the LDL-cholesterol levels returned to baseline by day 10 following administration of non-pH sensitive antibody, LDL cholesterol stayed

- 77 -

suppressed until day 21 in monkeys treated with pH sensitive antibodies. HDL levels remained essentially unchanged as a result of antibody treatment (Figure 9A). Figure 10 demonstrates that the half life of pH sensitive anti-PCSK9 antibodies were extended as compared to non-pH sensitive L1L3.

5

Example 4: General Modeling for Antibodies with pH Dependent Antigen Binding

Computer modeling was used to predict whether an antibody with pH dependent binding to its generic antigen could impact antibody half life and/or the duration of lowering the antigen's amount or serum concentration. For purposes of this modeling, the following assumptions were made: 1) antibody, 1 uM dose of antibody in blood, 21 day antibody half-life; 2) simulation run for 100 days; antibody binding and pH dependent binding, $K_{on} = 1e5/M/s$, $K_{off} @ \text{neutral pH} = K_D * K_{on}$; pH dependent binding is modeled as an increase in K_{off} in the acidic endosomes, $K_{off} \text{ at acidic pH} = R * K_{off} \text{ at neutral pH}$.

Figure 15 details the trafficking model for antibodies with pH dependent binding used for modeling, and the equations defining the model are as follows:

$$d/dt(\text{Normal\_Dose}) = -k\_dist * \text{Normal\_Dose}$$

$$d/dt(\text{mAb}) = k\_dist * \text{Normal\_Dose} - (\text{mAb} * k_{on} * \text{Normal\_antigen}) + (k_{on} * K_D * \text{mAb\_antigen}) - k_{blood\_endo} * \text{mAb} / V_{Norm} + f1 * k_{blood\_endo} * \text{mAb\_e} / V_{Norm} + (1-f1) * f2 * k_{blood\_endo} * \text{mAb\_le} / V_{Norm}$$

$$d/dt(\text{mAb\_antigen}) = (\text{mAb} * k_{on} * \text{Normal\_antigen}) - (k_{on} * K_D * \text{mAb\_antigen}) - k_{blood\_endo} * \text{mAb\_antigen} / V_{Norm} + f1 * k_{blood\_endo} * \text{mAb\_antigen\_e} / V_{Norm} + (1-f1) * f2 * k_{blood\_endo} * \text{cplx\_le} / V_{Norm}$$

$$d/dt(\text{Normal\_antigen}) = -(\text{mAb} * k_{on} * \text{Normal\_antigen}) + (k_{on} * K_D * \text{mAb\_antigen}) + \ln(2) / \text{antigen\_half-life} * \text{antigen\_level} - \ln(2) / \text{antigen\_half-life} * \text{Normal\_antigen} - k_{blood\_endo} * \text{Normal\_antigen} / V_{Norm} + f1 * k_{blood\_endo} * \text{Endosomes\_antigen\_e} / V_{Norm}$$

$$d/dt(\text{mAb\_e}) = k_{blood\_endo} * \text{mAb} / V_{Endo} - f1 * k_{blood\_endo} * \text{mAb\_e} / V_{Endo} - (\text{mAb\_e} * k_{on} * \text{Endosomes\_antigen\_e}) + (k_{on} * K_D * \text{mAb\_antigen\_e}) - (1-f1) * k_{blood\_endo} * \text{mAb\_e} / V_{Endo}$$

$$d/dt(\text{mAb\_antigen\_e}) = k_{blood\_endo} * \text{mAb\_antigen} / V_{Endo} - f1 * k_{blood\_endo} * \text{mAb\_antigen\_e} / V_{Endo} + (\text{mAb\_e} * k_{on} * \text{Endosomes\_antigen\_e}) - (k_{on} * K_D * \text{mAb\_antigen\_e}) - (1-f1) * k_{blood\_endo} * \text{mAb\_antigen\_e} / V_{Endo}$$

$$d/dt(\text{Endosomes\_antigen\_e}) = k_{blood\_endo} * \text{Normal\_antigen} / V_{Endo} - f1 * k_{blood\_endo} * \text{Endosomes\_antigen\_e} / V_{Endo} - (\text{mAb\_e} * k_{on} * \text{Endosomes\_antigen\_e}) + (k_{on} * K_D * \text{mAb\_antigen\_e}) - (1-f1) * k_{blood\_endo} * \text{Endosomes\_antigen\_e} / V_{Endo}$$

$$d/dt(\text{mAb\_le}) = -(1-f1) * f2 * k_{blood\_endo} * \text{mAb\_le} / V_{LEndo} + (1-f1) * k_{blood\_endo} * \text{mAb\_e} / V_{LEndo} - (\text{mAb\_le} * k_{on} * \text{Antigen\_le}) + (R * k_{on} * K_D * \text{cplx\_le}) - (1-f1) * (1-f2) * k_{blood\_endo} * \text{mAb\_le} / V_{LEndo}$$

- 78 -

$$d/dt(cplx\_le) = -(1-f1) * f2 * k\_blood\_endo * cplx\_le / V_{LEndo} + (1-f1) * k\_blood\_endo * mAb\_antigen\_e / V_{LEndo} + (mAb\_le * kon * Antigen\_le) - (R * kon * K_D * cplx\_le) - (1-f1) * (1-f2) * k\_blood\_endo * cplx\_le / V_{LEndo}$$

$$5 \quad d/dt(Antigen\_le) = + (1-f1) * k\_blood\_endo * Endosomes\_antigen\_e / V_{LEndo} - (mAb\_le * kon * Antigen\_le) + (R * kon * K_D * cplx\_le) - (1-f1) * k\_blood\_endo * Antigen\_le / V_{LEndo}$$

The parameters used in the model are described below in Table 8.

10 Table 8.

VNorm	5.6 L	Volume of blood
VEndo	0.06 L	Volume of early endosomes
VLEndo	0.06 L	Volume of late endosomes
k_dist	0.48/days	Rate of transport into blood
kon	0.0001/nM/s	mAb-antigen association rate
k_blood_endo	11.5 L/day	Rate of endosomal internalization
f1	0.7	Fraction recycling from early endosomes
f2	0.95	Fraction mAb recycling from late endosomes
K _D	variable	Binding affinity [nM]
R	variable	Ratio of affinity at endosomal vs. neutral pH
antigen_halfife	variable	Half-life of antigen in blood [days]
antigen_level	variable	Level of antigen in the blood [nM]

The heatmaps shown in Figure 4 show how much more an antibody with pH dependent binding would impact antigen knockdown beyond knockdown by an antibody without pH dependent binding. This knockdown quantity is determined by measuring of the area between the free antigen curves for the two antibodies over the 100 day simulation. It can be thought of as how many days longer an antibody with pH dependent binding would impact antigen knockdown beyond knockdown by an antibody without pH dependent binding, though these two metrics do not have to correlate exactly. Lighter areas on the map reflect longer duration and/or stronger knockdown of free antigen. The heatmap for Figure 11 shows how the potential antibodies with pH dependent antigen binding would impact antigen knockdown if the antigen was DKK1, IgE or C5. For each of these antigens, an antibody with pH dependent binding could extend antigen knockdown.

Figure 12 shows more detailed modeling for an antibody with pH dependent binding to IgE. An extended duration of IgE knockdown occurs if the antibody has a K_D of about 1 nM or greater and a K_D ratio at pH 6.0/ pH7.4 (R) of 3 or more.

- 79 -

Similar analysis for the antigen DKK1 is shown in Figure 13 and for C5 in Figure 14. For DKK1, an ideal range of K_D is 1.0-100 nM across the K_D ratio range of 3-30. For C5, the ideal range of K_D is also 1.0-100 nM for the K_D ratio range of 3-30.

5

Example 5: Generating and Screening anti-IgE Antibodies with pH dependent IgE binding

Histidine substitutions were made at the positions of the underlined residues in anti-IgE antibody 5.948-H100Y, which has the following variable light chain (VL) and variable heavy chain (VH) amino acid sequences (CDRs are in bold font).

VL

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR**SSQSL**HRNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIY
LGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQALQTPPAT**FGGGTKVE
 IK (SEQ ID NO: 25)

15

VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT**F**TSYDINWVRQATGQGLEWMGWM
DPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYY**DSDGYYS**
FSGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 26)

20

The antibodies were tested for IgE binding at 25°C. For determination of affinities and kinetic constants, all experiments were performed on a Biacore T200 biosensor.

A biotin-capture surface was prepared by immobilization of NeutrAvidin: all flow cells of a Biacore CM4 sensor chip were activated with a 1:1 (v/v) mixture of 400 mM EDC and 100 mM NHS for 7 minutes, at a flow rate of 10 μ L/min. NeutrAvidin (Pierce, product #: 31000) was diluted to 100 μ g/mL in 10 mM Sodium Acetate pH 4.5 and injected on all flow cells for 7 minutes at 20 μ L/min. All flow cells were blocked with 100 mM Ethylenediamine in 150 mM Borate buffer pH 8.5 for 7 minutes at 10 μ L/min.

The IgE construct (human IgE-Fc (Ch2-Ch3-Ch4), expressed and purified in-house) was minimally biotinylated by incubating IgE with an equimolar amount of EZ-Link NHS-LC-LC-biotin (Thermo Scientific, catalog # 21343) for 30 min at room temperature. Free biotin was removed via buffer exchange.

All Biacore experiments were performed using two of the four flow cells (1&2 or 3&4) of the sensor chip in parallel. The downstream flow cell was used as analysis flow

- 80 -

cell while the other flow cell was used as a reference surface. Thus, biotinylated IgE (B-IgE) was captured on the analysis flow cell and every purified Fab fragment was injected over both. The sensorgram from the reference flow cell was subtracted from that of the analysis flow cell.

5 B-IgE was diluted into running buffer to a final concentration of 5 ug/mL immediately before capture. At pH 6.0, B-IgE was injected at 10 uL/min for 60 seconds. At pH 7.4, B-IgE was injected for 80 seconds to obtain similar capture levels. The kinetics assay was run using a kinetic titration methodology as described in Karlsson et al., Anal Biochem 349: 136-147, 2006.

10 Following capture of B-IgE, a purified Fab fragment was injected at 30 µL/min on analysis and reference flow cells in a series of injections from low to high concentration. The top concentration of Fab ranged from 30 nM to 200 nM and the dilution factor was 3-fold. Each Fab dilution was injected for 2 minutes, followed by a final dissociation time of 30 minutes after the last injection. A similar set of injections was performed with
15 running buffer in place of Fab for double-referencing purposes (double-referencing as described in Myszkowski, J Mol Recognit 12: 279-284, 1999). The double-referenced sensorgrams were fit globally to a simple 1:1 Langmuir with mass transport binding model.

The experiments were performed at pH 6.0 and 7.4 using sample and running
20 buffers of 10 mM Sodium Phosphate, 150 mM Sodium Chloride, 0.05% Tween-20, 1 mg/mL BSA, pH 6 and 10 mM Sodium Phosphate, 150 mM Sodium Chloride, 0.05% Tween-20, 1 mg/mL BSA, pH 7.4, respectively.

As shown in Table 9 below, histidine substitution in the IgE antibody 5.948-H100Y successfully resulted in antibodies with a faster k_{off} at pH 6.0 and higher K_D and
25 k_{off} ratios at pH 6.0/ pH 7.4.

Table 9. Effect of histidine substitution on antigen binding by IgE antibodies

		pH 6.0				pH 7.4				
	$k_a(M^{-1}S^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$k_d(min)$	$K_D(M)$	$k_a(M^{-1}S^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$k_d(min)$	$K_D(M)$	$k_d-pH6/k_d-pH7.4$	$K_D ratio pH 6.0/pH 7.4$
H100Y	1.02E+06	1.52E-04	76.00	1.49E-10	1.03E+06	5.01E-05	230.5879	4.87E-11	3.03	3.1
L38H312H100Y	3.29E+05	1.22E-02	0.95	3.71E-08	2.02E+05	1.08E-03	10.69672	5.33E-09	11.30	7.0
H25H100Y	2.98E+05	1.51E-03	7.65	5.08E-09	3.11E+05	1.97E-04	58.64189	6.34E-10	7.66	8.0

- 81 -

H17H25H100Y	2.23E+05	3.64E-03	3.17	1.63E-08	2.22E+05	4.22E-04	27.37548	1.90E-09	8.63	8.6

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

- 82 -

It is claimed:

1. An antibody with pH dependent binding which specifically binds an antigen with higher affinity at pH 7.4 than at pH 6.0, wherein the K_D ratio and/or the k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 and at 25°C is more than, or ranges between, 2, 3, 4, 8, 10, 16, or more, and
5 wherein the antibody has reduced plasma clearance in vivo when exposed to said antigen as compared to an antibody without pH dependent binding that has a similar affinity for the antigen at pH 7.4, but has a comparable K_D and/or k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 that is less than 2.
2. An antibody with pH dependent binding which specifically binds an antigen with
10 higher affinity at pH 7.4 than at pH 6.0, wherein the K_D ratio and/or the k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 and at 25°C is more than, or ranges between 2, 3, 4, 8, 10, 16, or more, and wherein the antigen is both membrane bound and soluble in vivo and wherein the antibody mediates increased localization to a cell membrane receptor as compared to an antibody that has a similar affinity for the antigen at pH 7.4 but has a comparable K_D
15 and/or k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 that is less than 2.
3. The antibody of claim 1 or 2, wherein the antigen is not the interleukin-6 receptor.
4. The antibody of claim 2, wherein the antigen is a soluble receptor that is a non-signaling decoy.
5. The antibody of claim 2, wherein said antibody with pH dependent binding is an
20 antibody drug conjugate, mediates antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), and/or complement-dependent cytotoxicity (CDC).
6. An antibody with pH dependent binding which specifically binds an antigen with higher affinity at pH 7.4 than at pH 6.0, wherein the K_D ratio and/or the k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 and at 25°C is more than, or ranges between, 2, 3, 4, 8, 10, 16, or more, and
25 wherein the decrease in the in vivo amount of non-antibody bound antigen is prolonged when exposed to said antibody as compared to an antibody without pH dependent binding that has a similar affinity for the antigen at pH 7.4, but has a comparable K_D and/or k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 that is less than 2.
7. An antibody with pH dependent binding which specifically binds an antigen with
30 higher affinity at pH 7.4 than at pH 6.0, wherein the K_D ratio and/or the k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 and at 25°C is more than, or ranges between, 2, 3, 4, 8, 10, 16, or more, and wherein there is a decrease in the vivo amount of antibody-bound antigen as compared

- 83 -

to an antibody without pH dependent binding that has a similar affinity for the antigen at pH 7.4, but has a comparable K_D or k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 that is less than 2.

8. An agonist antibody with pH dependent binding which specifically binds an antigen with higher affinity at pH 7.4 than at pH 6.0, wherein the K_D ratio and/or the k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 and at 25°C is more than, or ranges between, 2, 3, 4, 8, 10, 16, or more, and wherein the antigen is a receptor and the receptor has reduced clearance in vivo when exposed to said antibody as compared to an antibody that has similar affinity for the receptor at pH 7.4, but has a comparable K_D and/or k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 that is less than 2.
9. The antibody of any of claims 1-8, wherein the K_D ratio or k_{off} ratio at pH 6.0/pH 7.4 is more than, or ranges between, 20, 30, 40 or 100 or more.
10. The antibody of any of claims 1-9, wherein the binding of the antibody to the antigen at pH 7.4 has a K_D of about 0.01 nM to about 100 nM.
11. The antibody of claim 10, wherein the binding of the antibody to the antigen at pH 7.4 has a K_D of about 0.1 nM to about 10 nM.
12. The antibody of any of claims 1-11, wherein the binding of the antibody to the antigen at pH 7.4 has a k_{off} of about 1×10^{-4} s⁻¹ to about 1×10^{-1} s⁻¹.
13. The antibody of claim 12, wherein the binding of the antibody to the antigen at pH 7.4 has a k_{off} of about 1×10^{-3} s⁻¹ to about 1×10^{-1} s⁻¹.
14. The antibody of claim 1, wherein the antigen is PCSK9.
15. The antibody of claim 6, wherein the antigen is IgE, C5, or DKK1 and the K_D ranges between 1.0 nM to about 10 nM or between 1.0 nM to about 100 nM.
16. A method of extending interval dosing and/or decreasing the therapeutic dose for treating a patient with a therapeutic antibody, said method comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the antibody of any of claims 1-15, wherein said antibody has an extended pharmacodynamic effect and/or half life as compared to an antibody that has similar affinity at pH 7.4, but has a K_D ratio and/or k_{off} ratio at pH 6.0/7.4 that is less than 2.
17. A method of making an antibody with prolonged half-life and/or pharmacodynamic effect by regulating antibody binding affinity in a pH dependent manner, said method comprising selecting for antibody CDR histidine residues or other residues that optimize the microenvironment affecting pKa, such that antibody antigen binding has a K_D ratio

- 84 -

and/or k_{off} ratio at pH 6.0/pH7.4 that is more than, or ranges between, 2, 3, 4, 8, 10, 16, or more.

18. An antibody library enriched for histidines in CDR residues or other residues that optimize the microenvironment affecting pKa.

5 19. The method of claim 17, further comprising mutagenizing the antibody to achieve antibody affinity with a K_D at pH 7.4 of at least 100 nM.

20. An isolated antibody which specifically binds to PCSK9 and comprises a heavy chain variable region (VH) complementary determining region one (CDR1), a VH CDR2, and a VH CDR3 from the VH amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4 or 5 or a
10 variant thereof having one, two, three or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3.

21. The isolated antibody of claim 20, further comprising the light chain variable region (VL) CDR1, CDR2, and CDR3 of the VL amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 3 or a variant thereof having one, two, three or more conservative amino acid substitutions
15 in CDR1, CDR2, and/or CDR3.

22. The isolated antibody of claim 21, wherein the VH CDR1 has the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:6, the VH CDR2 has the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 7, the VH CDR3 has the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 8 or 9, the VL CDR1 has the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10, the VL CDR2
20 has the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 11, and the VL CDR3 has the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 12 or a variant thereof having one, two, three or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3.

23. The isolated antibody of claim 22, wherein the VH CDR3 has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 or a variant thereof having one, two, three or more
25 conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3.

24. The isolated antibody of claim 23, wherein the VH region comprises SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 5 and the VL region comprises SEQ ID NO: 3.

25. The isolated antibody of claim 24, wherein the VH region comprises SEQ ID NO: 5.

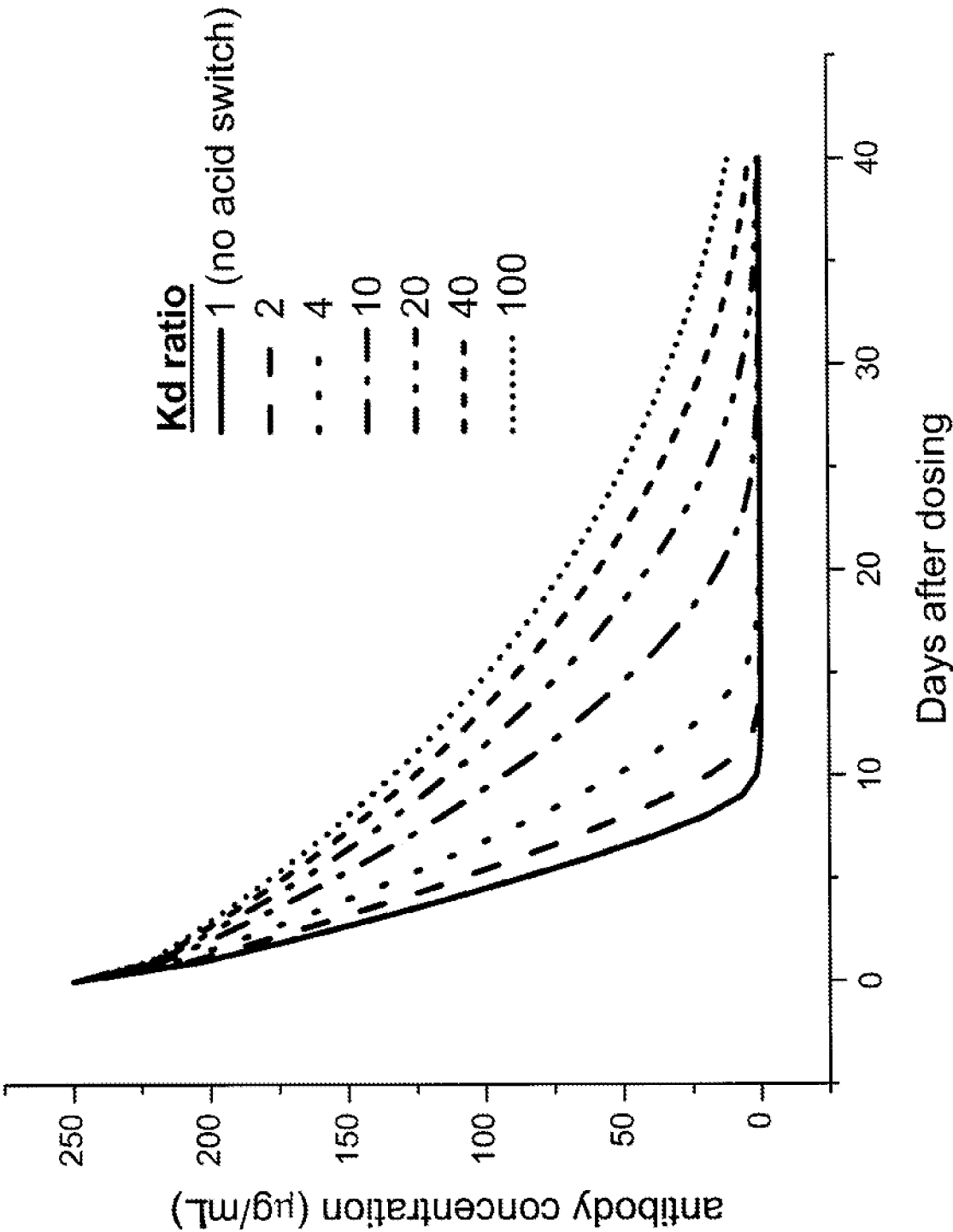
26. An antibody or antigen-binding portion thereof, encoded by the plasmid deposited at
30 the ATCC and having ATCC Accession No. PTA-10547, or PTA-10548, and/or PTA-10549.

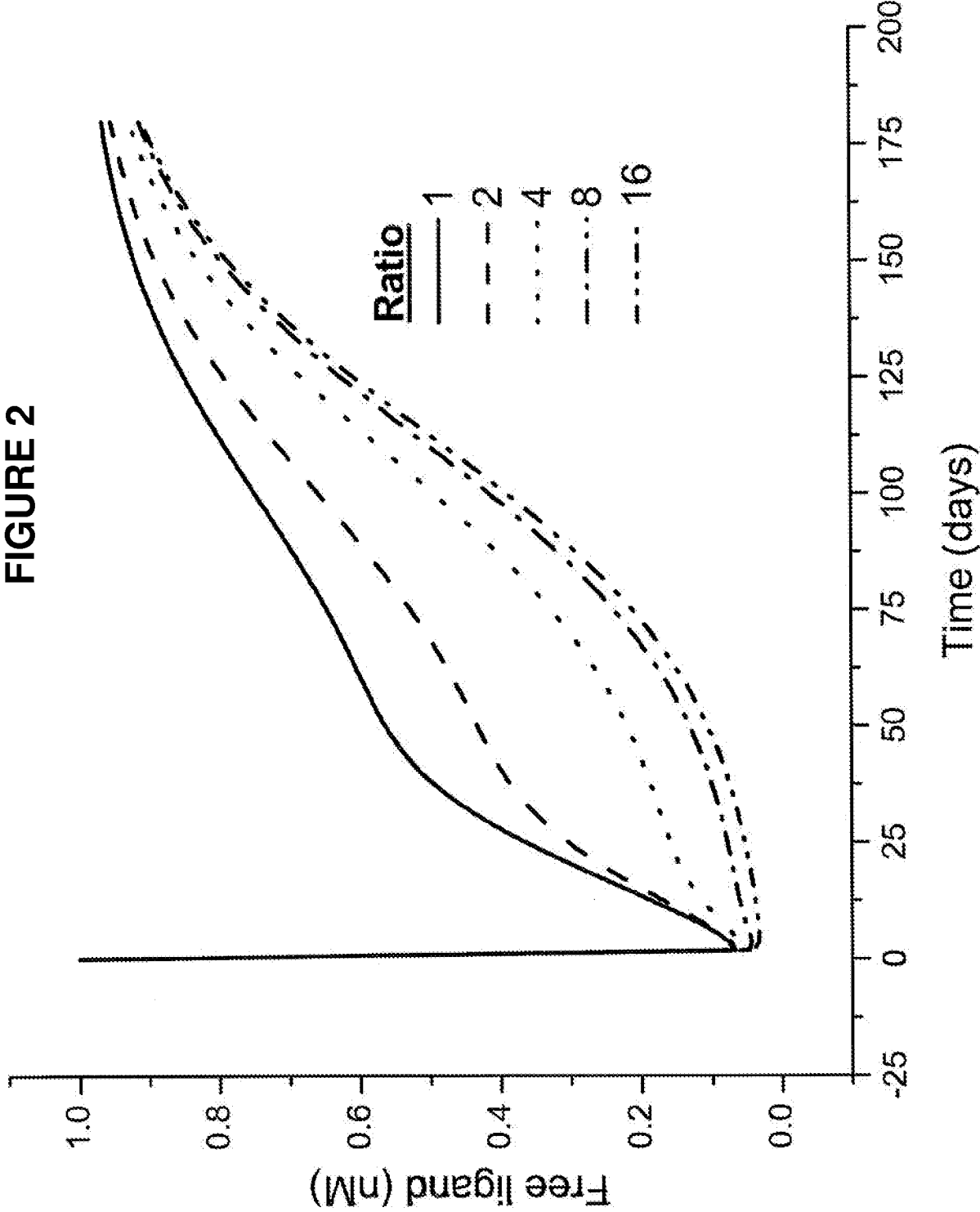
27. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of the antibody of any of claims 1-26.

- 85 -

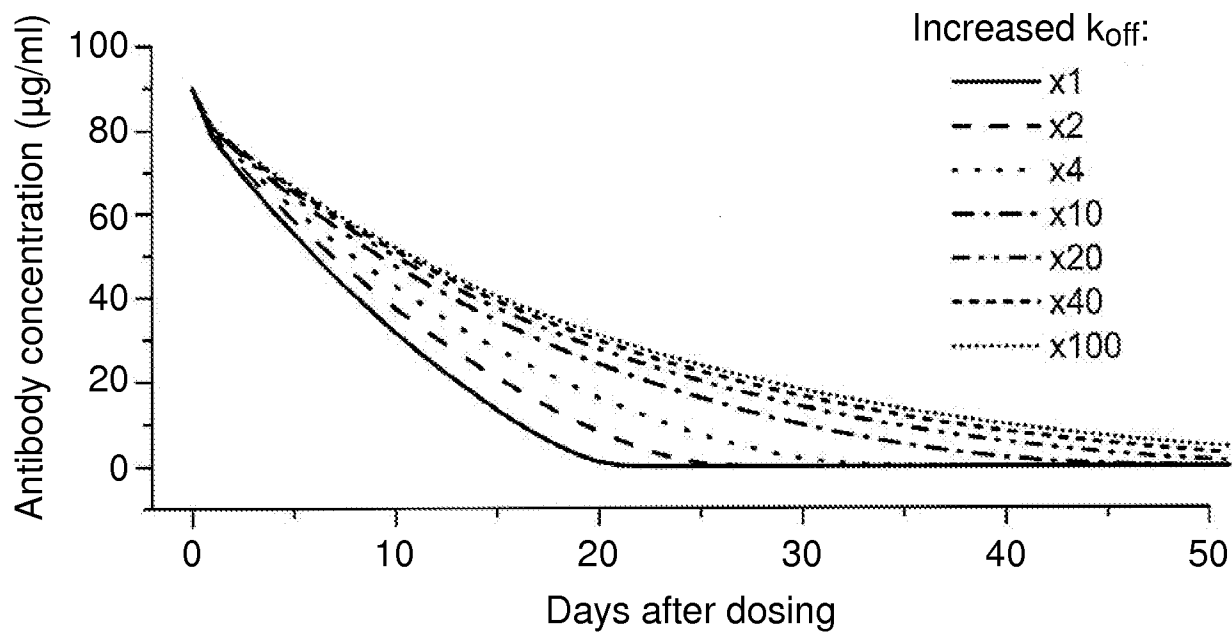
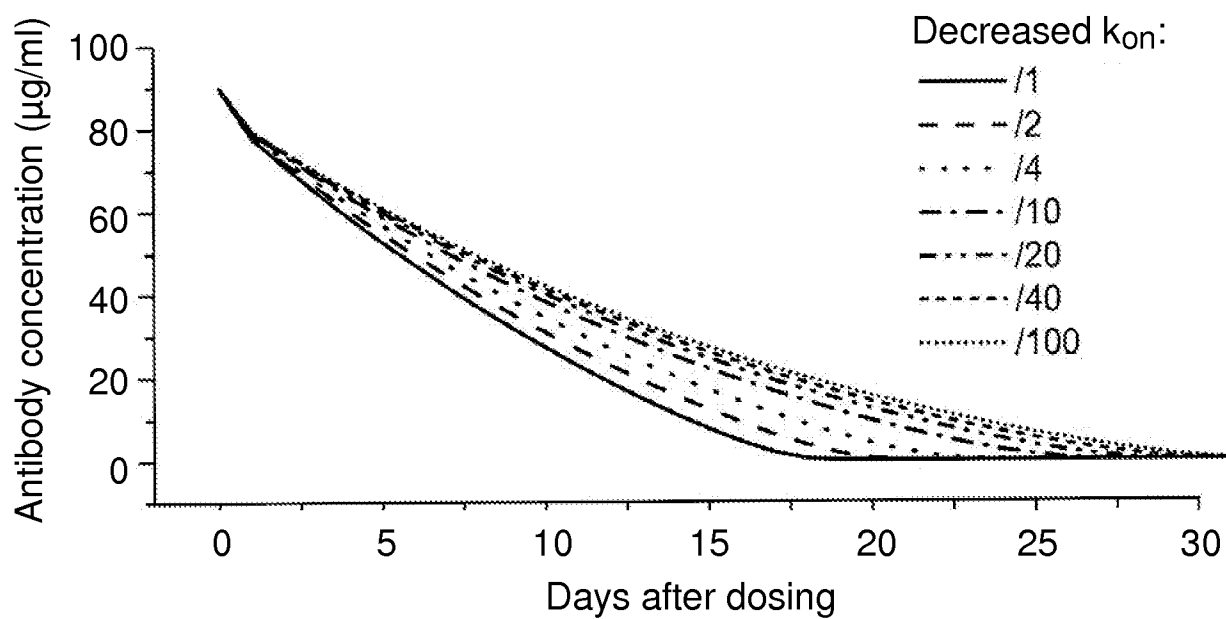
28. A host cell that recombinantly produces the antibody of any of claims 1-26.
29. An isolated nucleic acid encoding the antibody of any of claims 1-26.
30. An isolated plasmid as deposited at the ATCC and having ATCC Accession No. PTA-10547, or PTA-10548, and/or PTA-10549.
- 5 31. A method for reducing a level of LDL-cholesterol in blood of a subject in need thereof, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the antibody of claims 1-26.

FIGURE 1

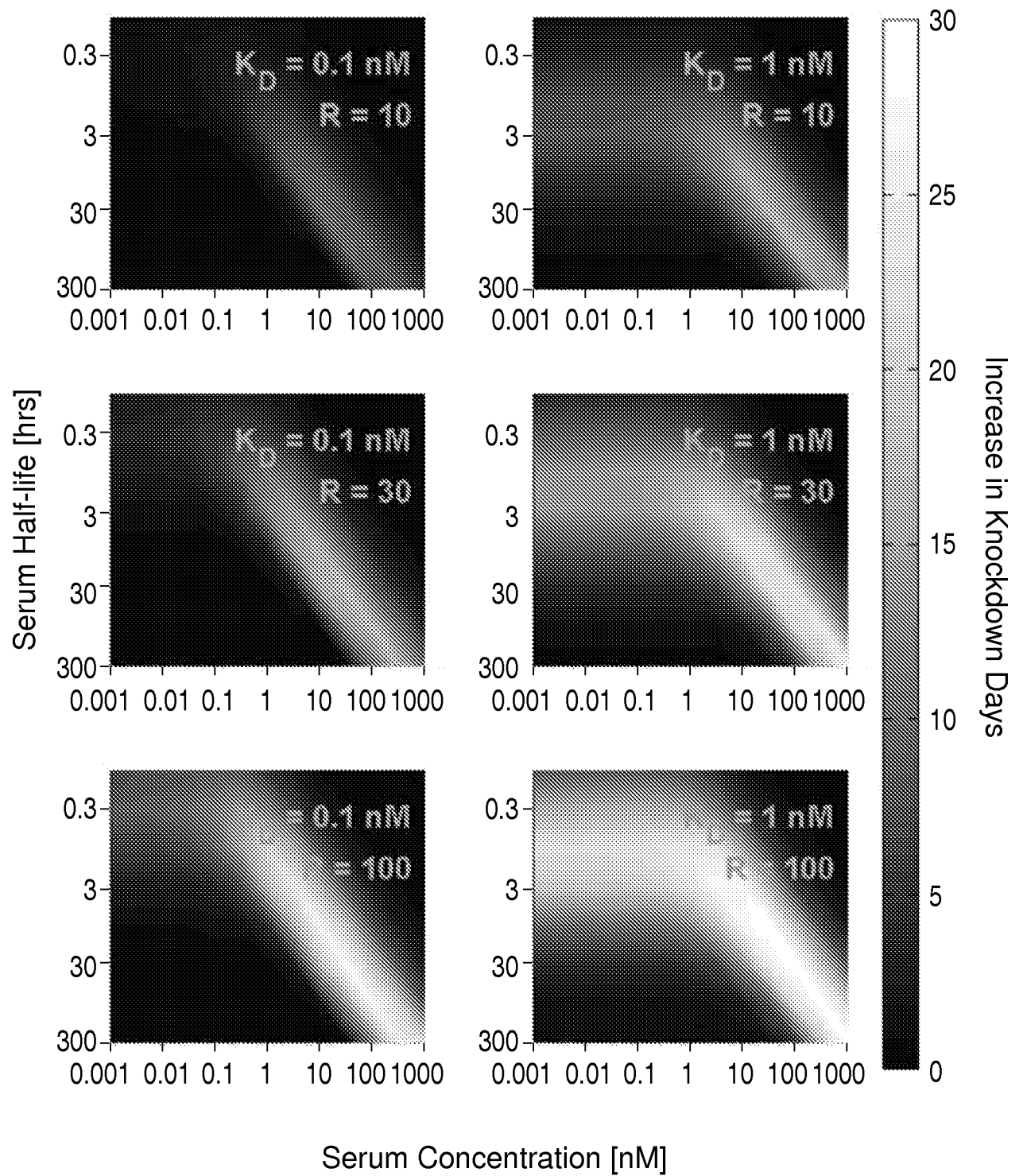




3/16

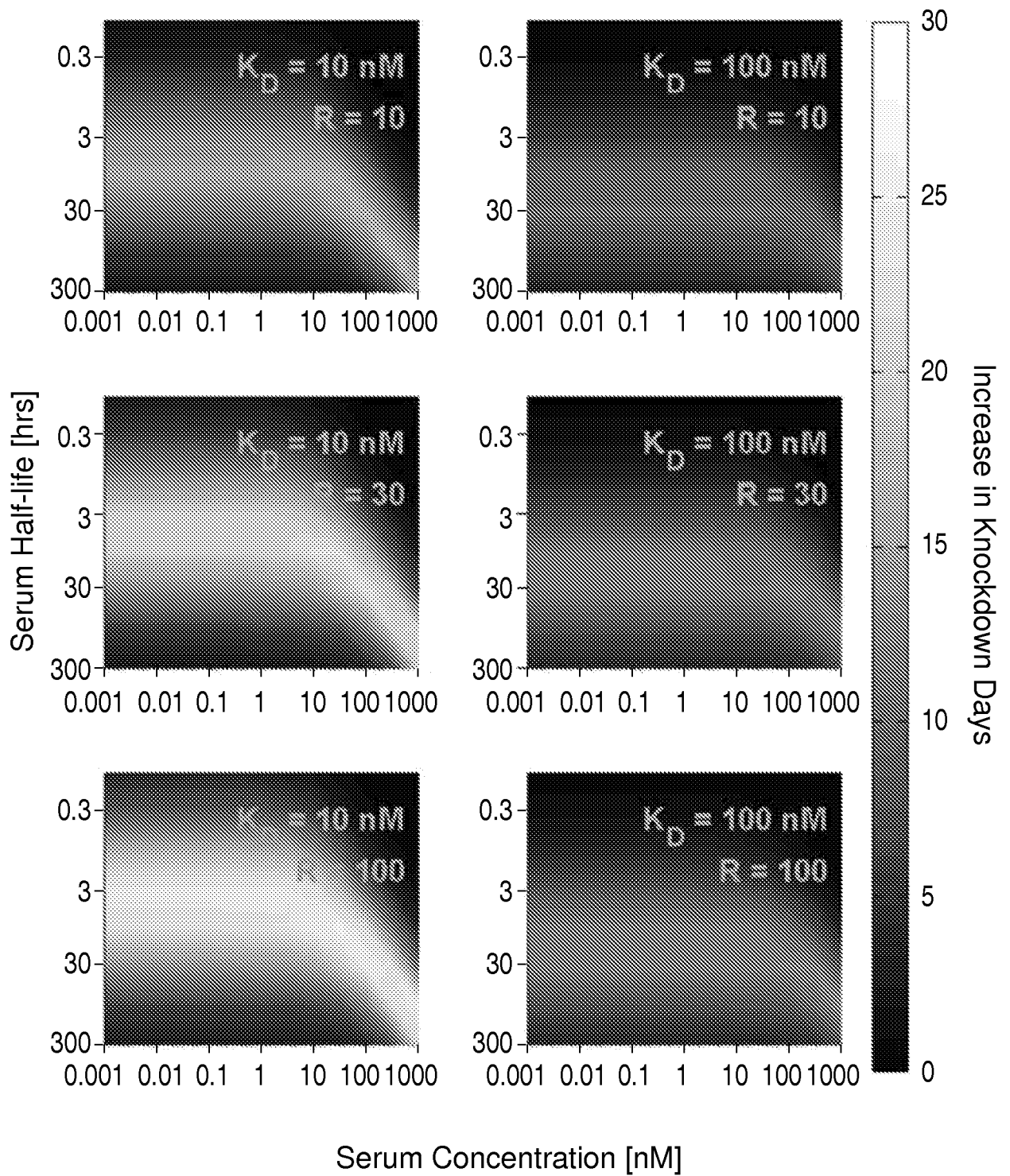
FIGURE 3A**FIGURE 3B**

4/16

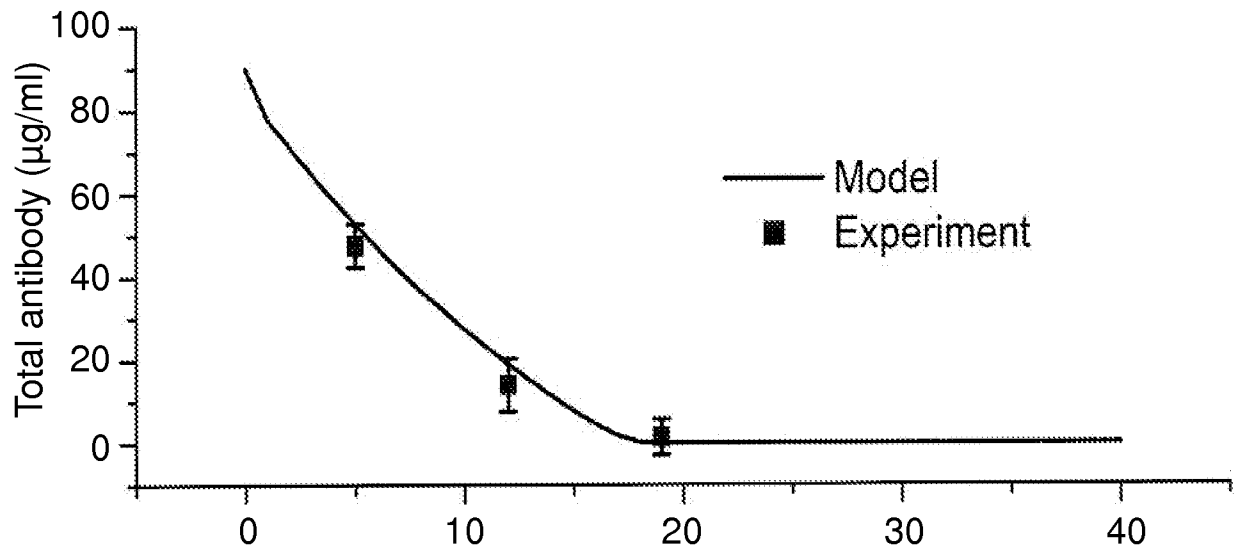
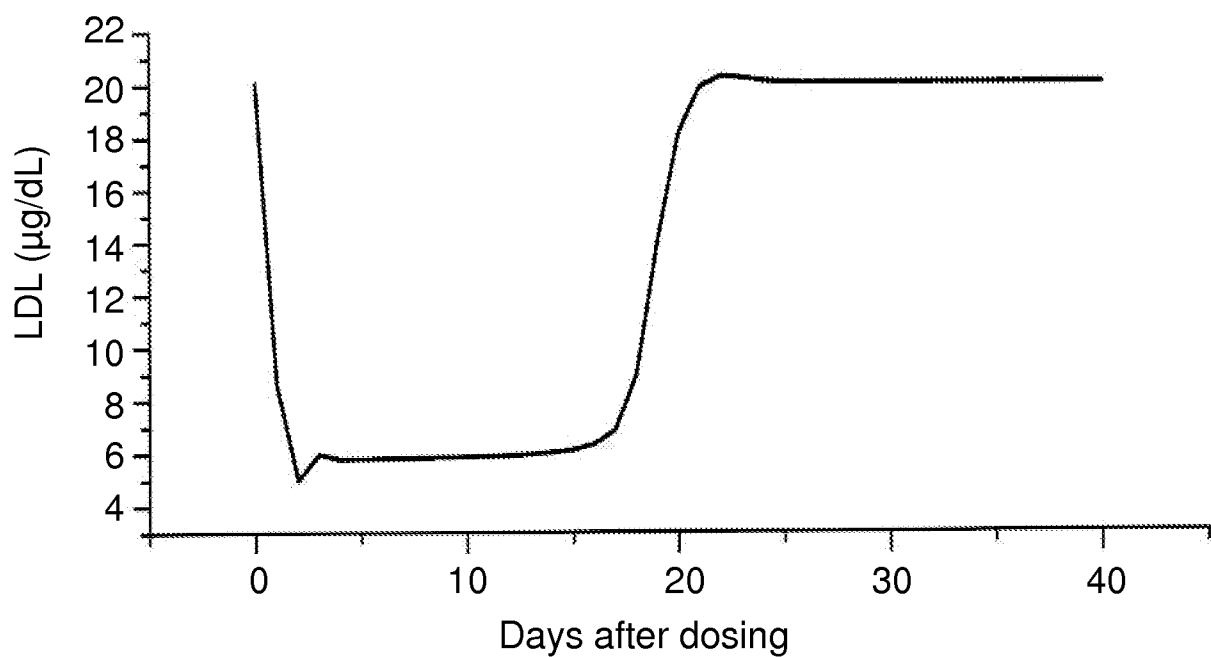
FIGURE 4A

5/16

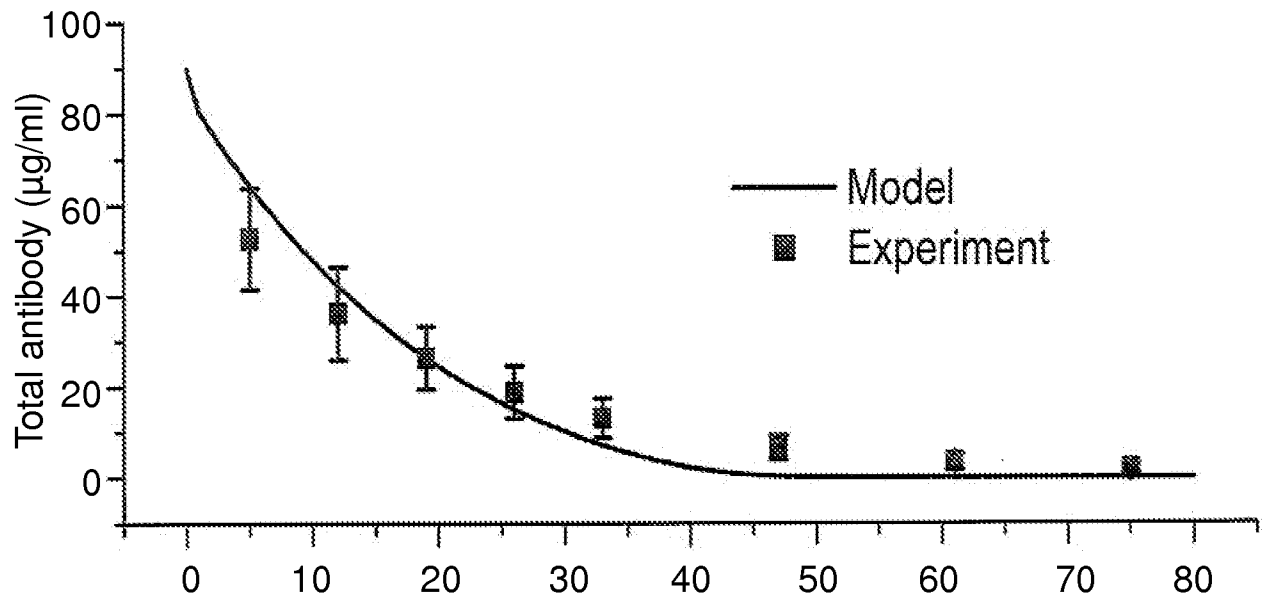
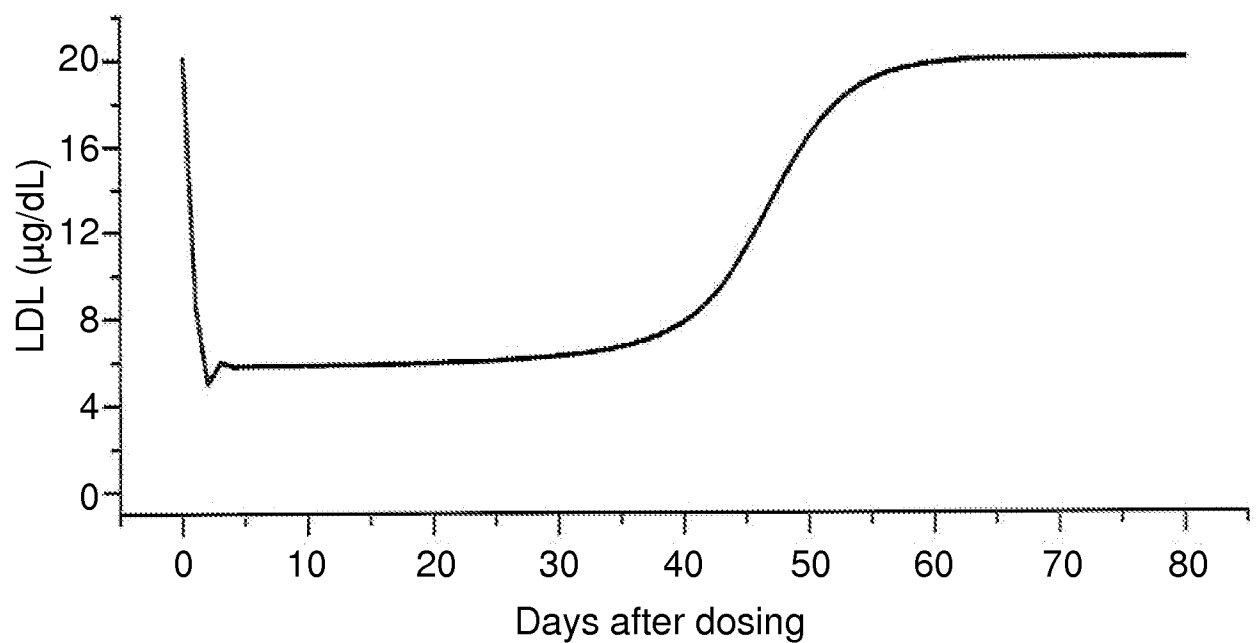
FIGURE 4B



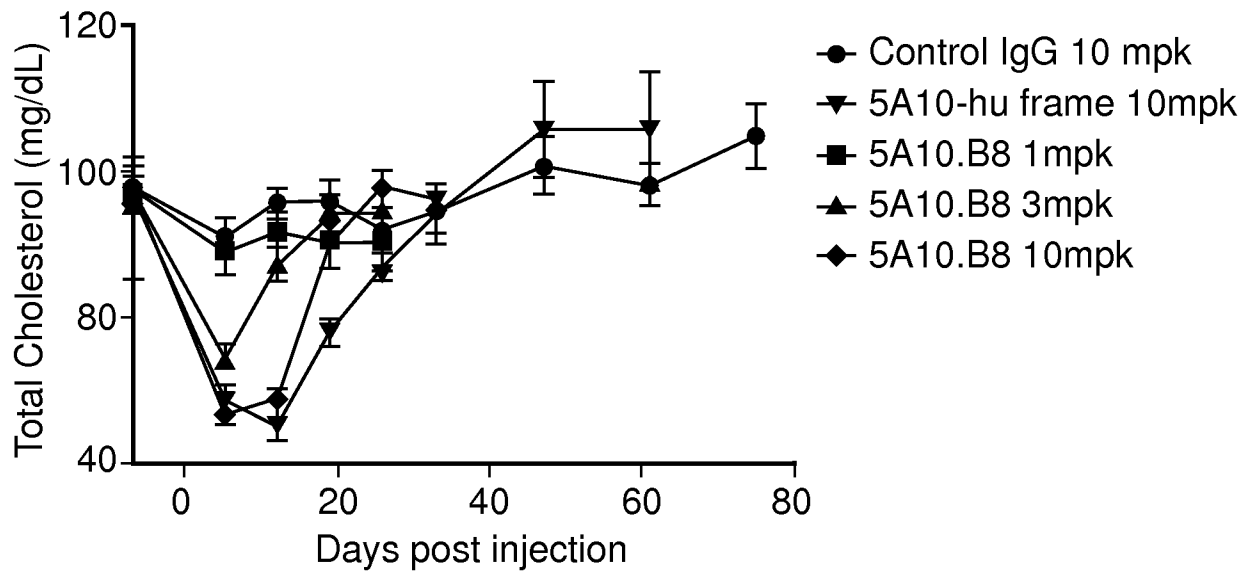
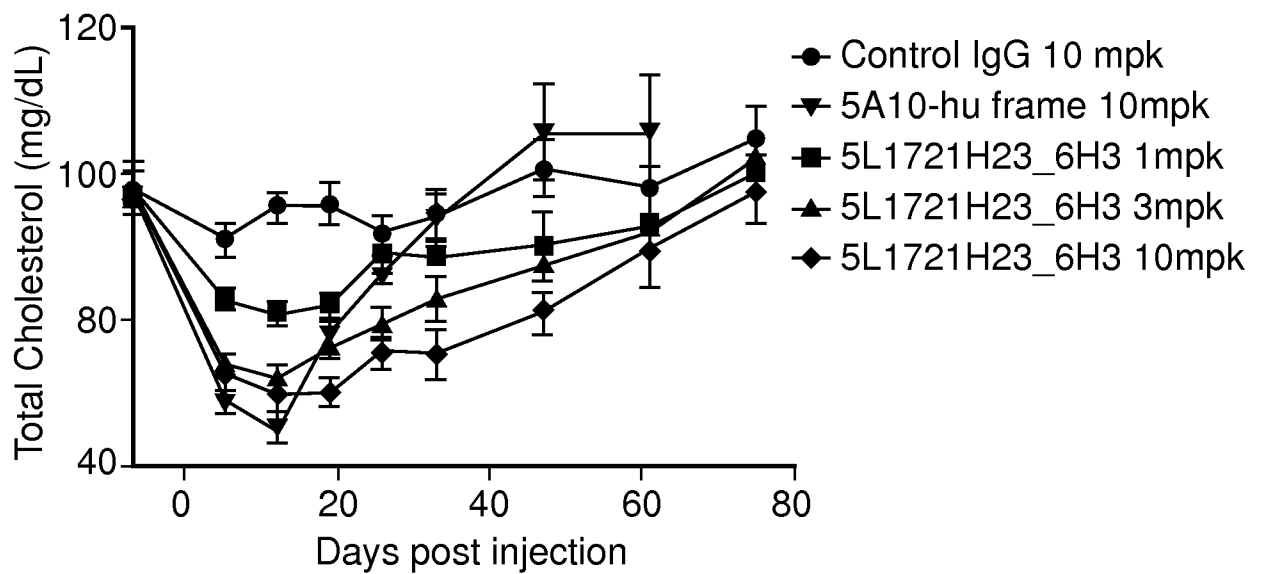
6/16

FIGURE 5A**FIGURE 5B**

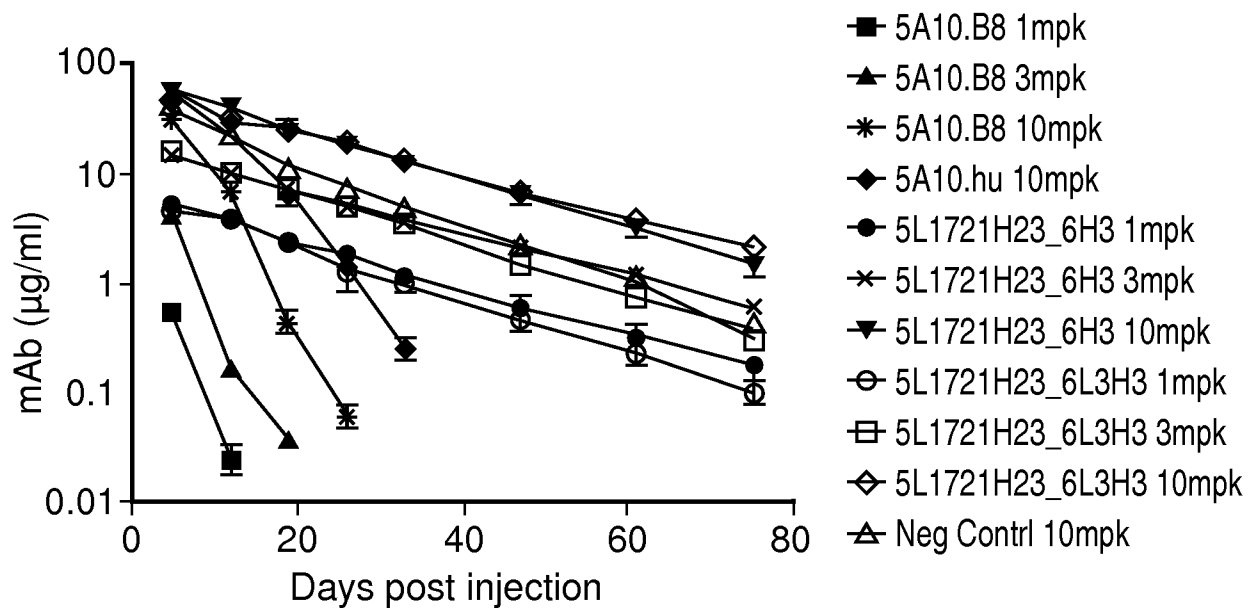
7/16

FIGURE 6A**FIGURE 6B**

8/16

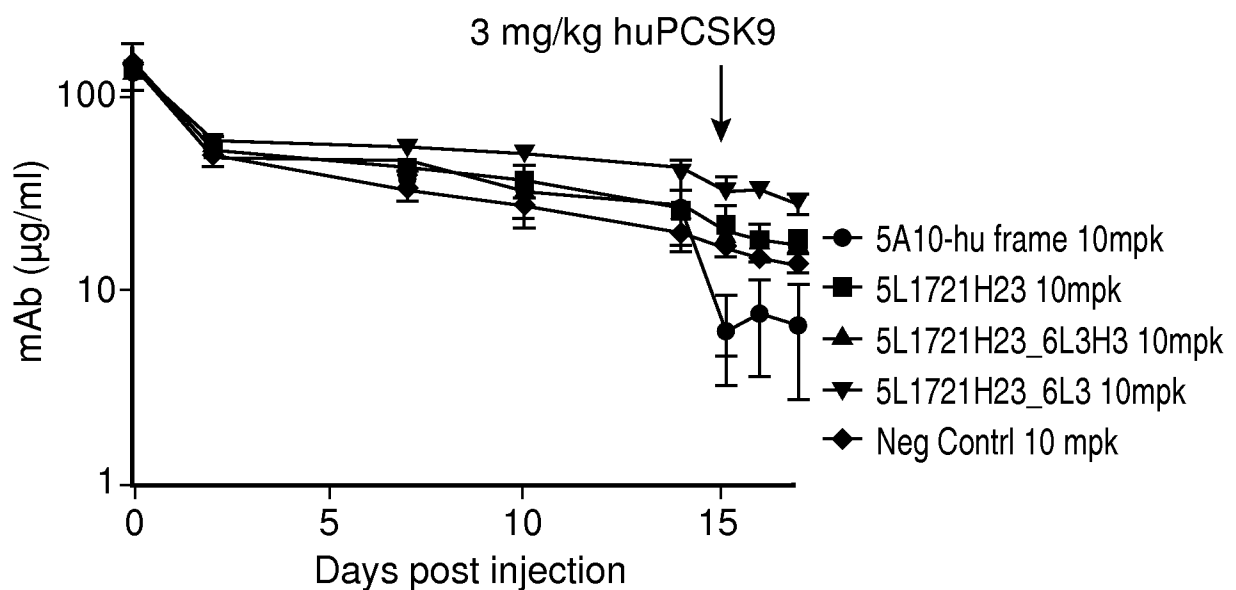
FIGURE 7A**FIGURE 7B**

9/16

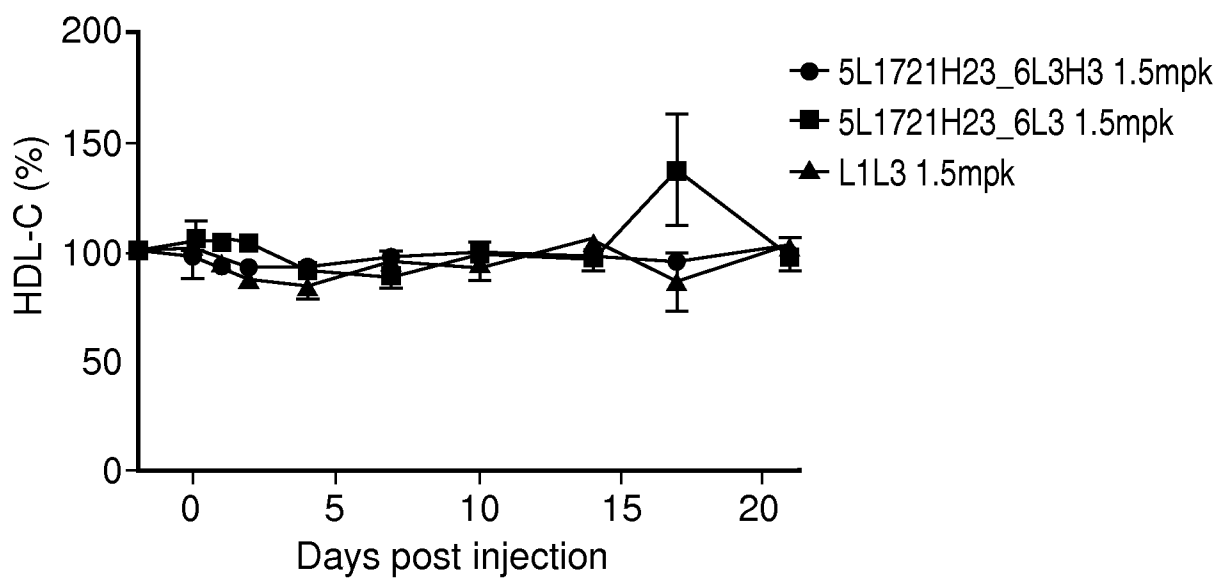
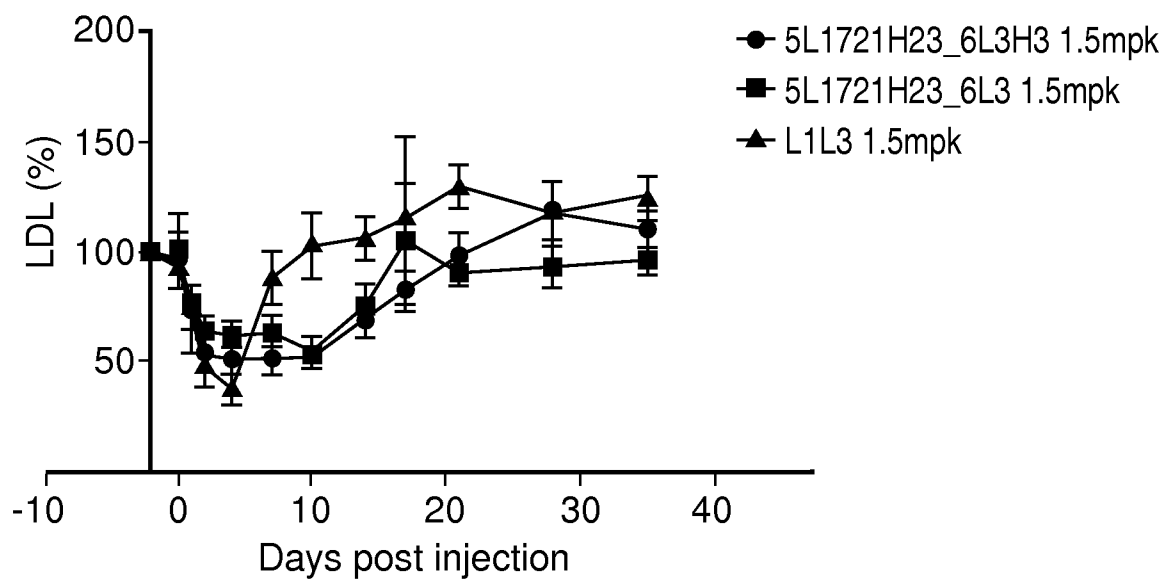
FIGURE 8A

* one outlier in 5A10 group eliminated

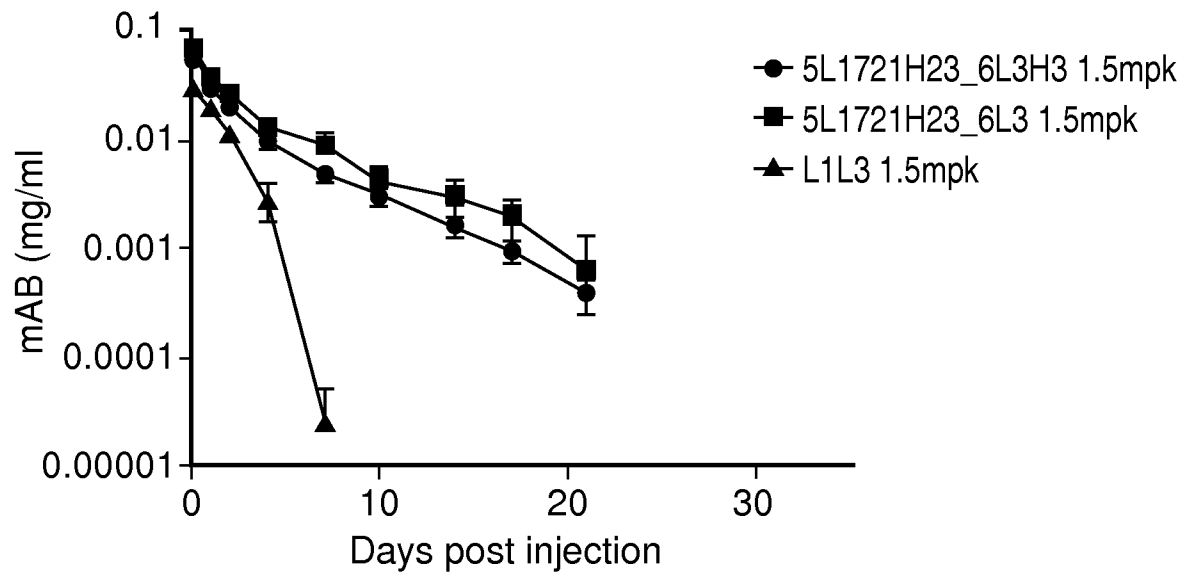
** mAb concentrations below detection limit are replaced with the detection limit value

FIGURE 8B

10/16

FIGURE 9A**FIGURE 9B**

11/16

FIGURE 10

12/16

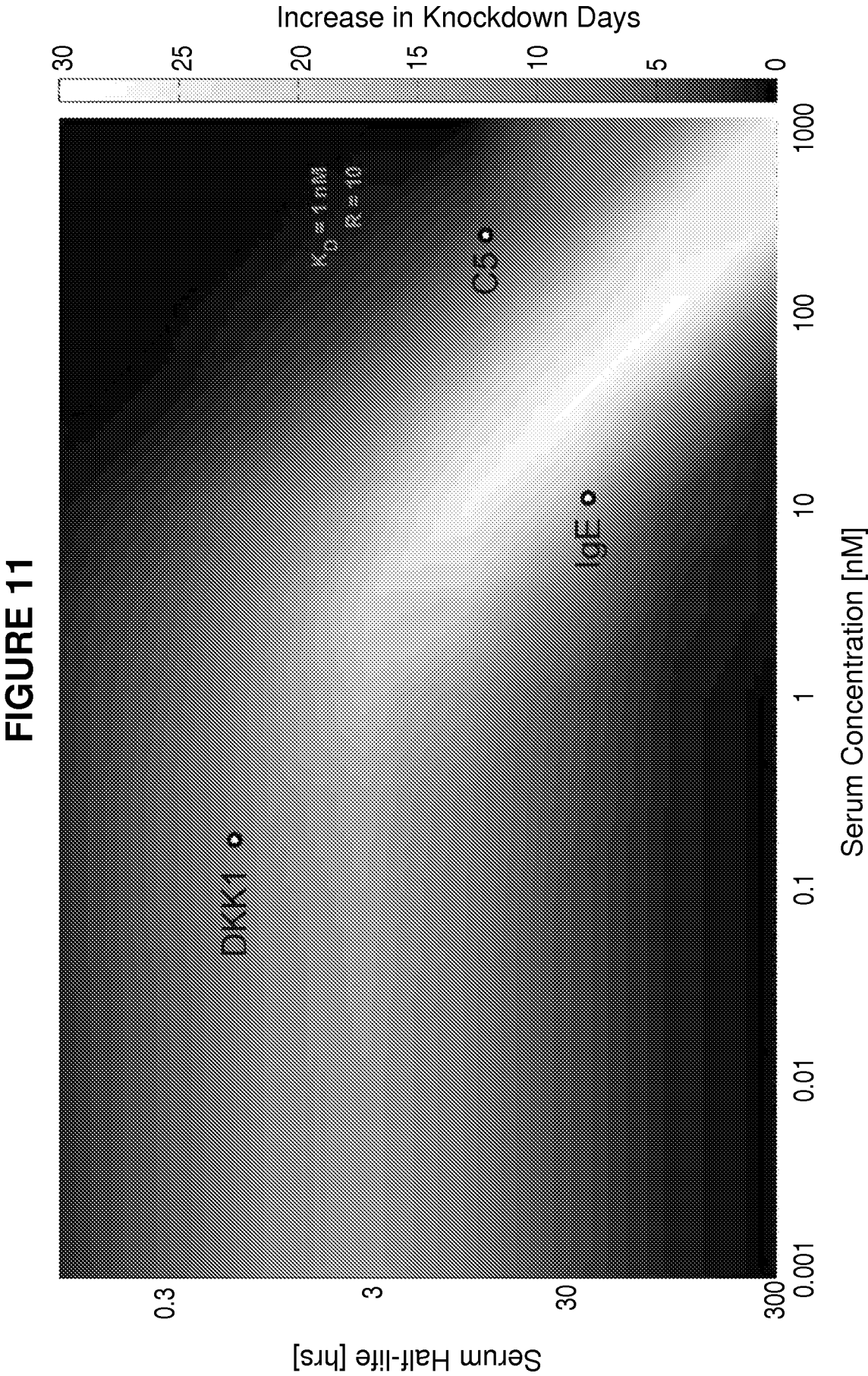


FIGURE 12

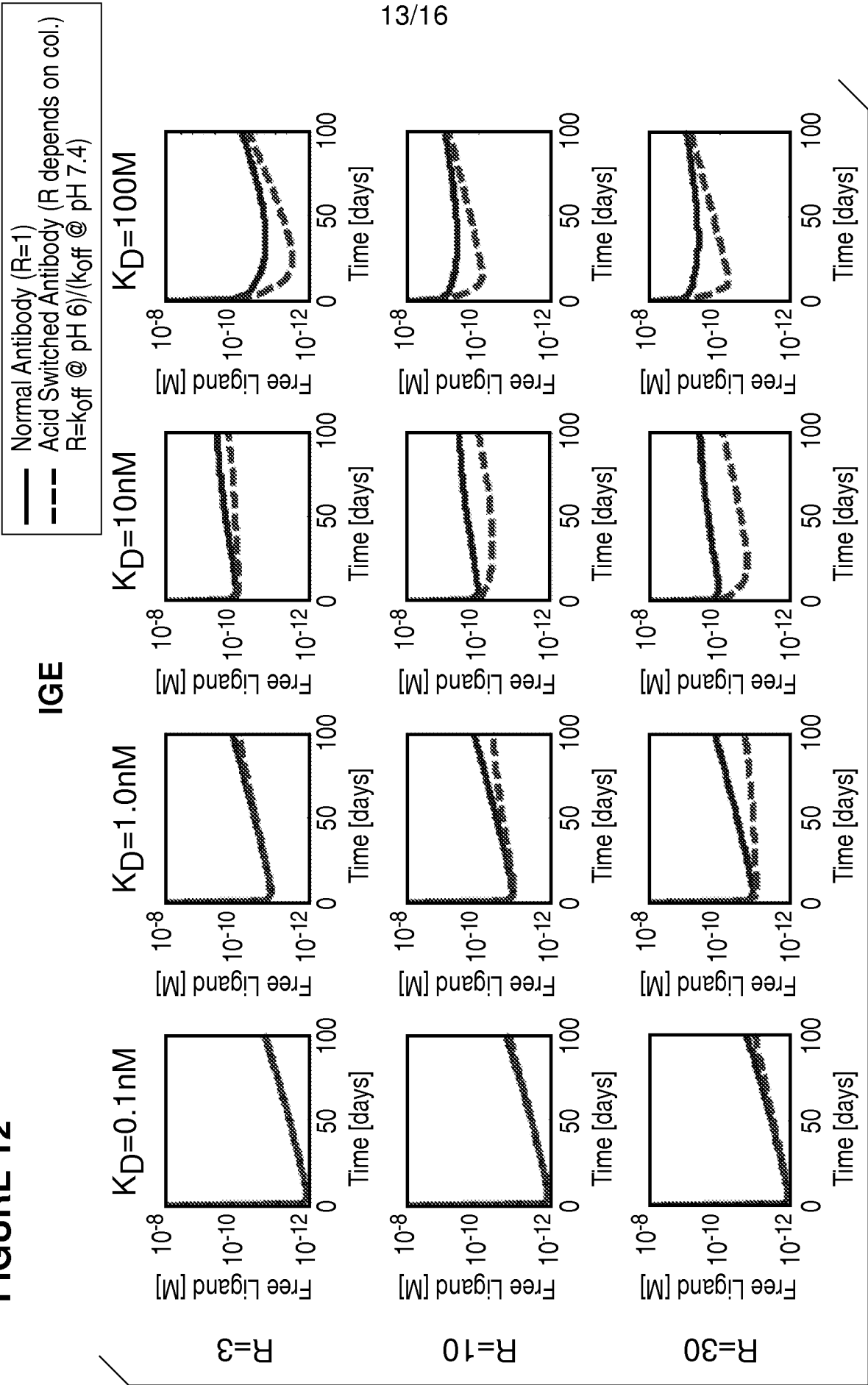
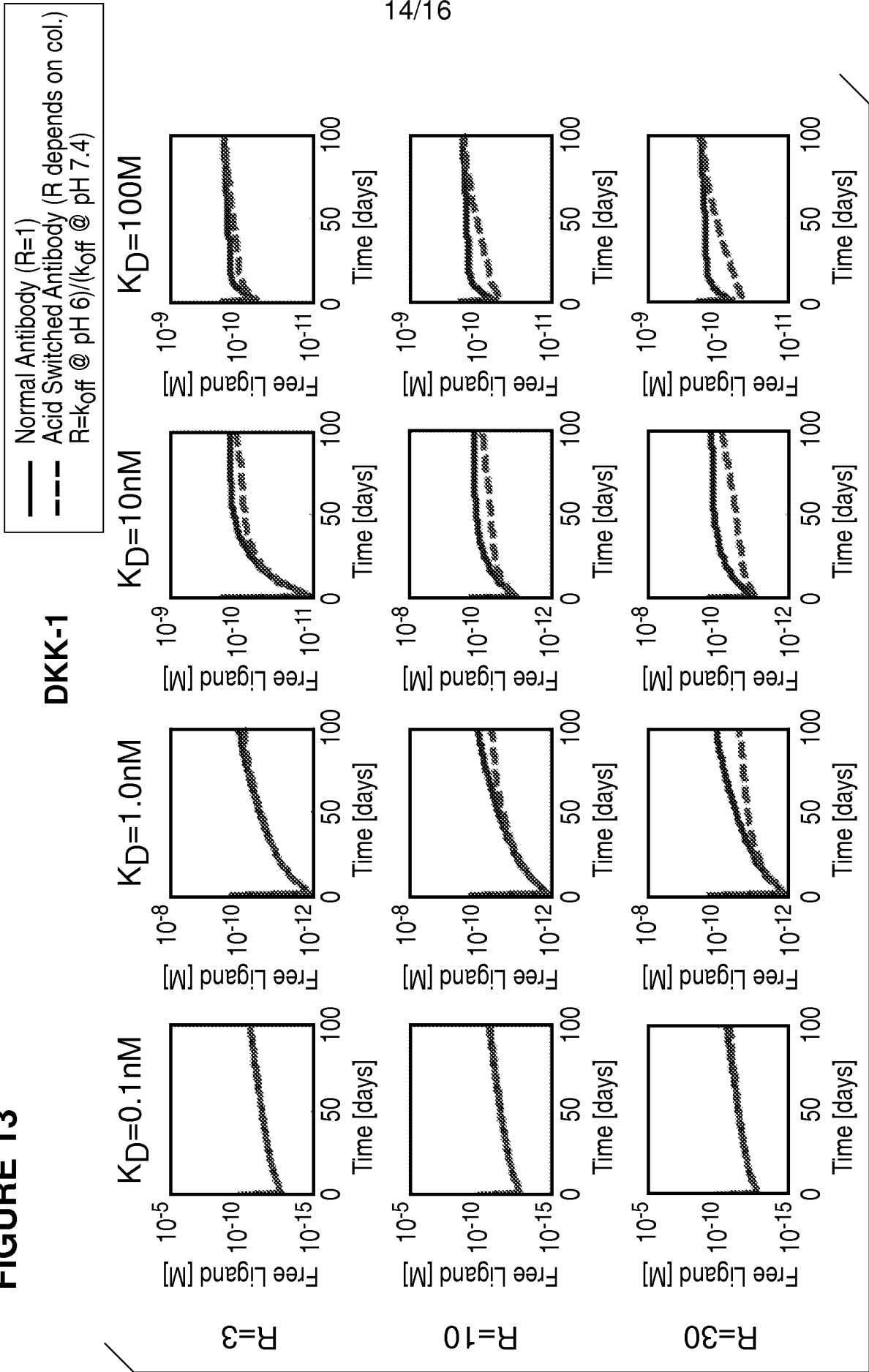


FIGURE 13



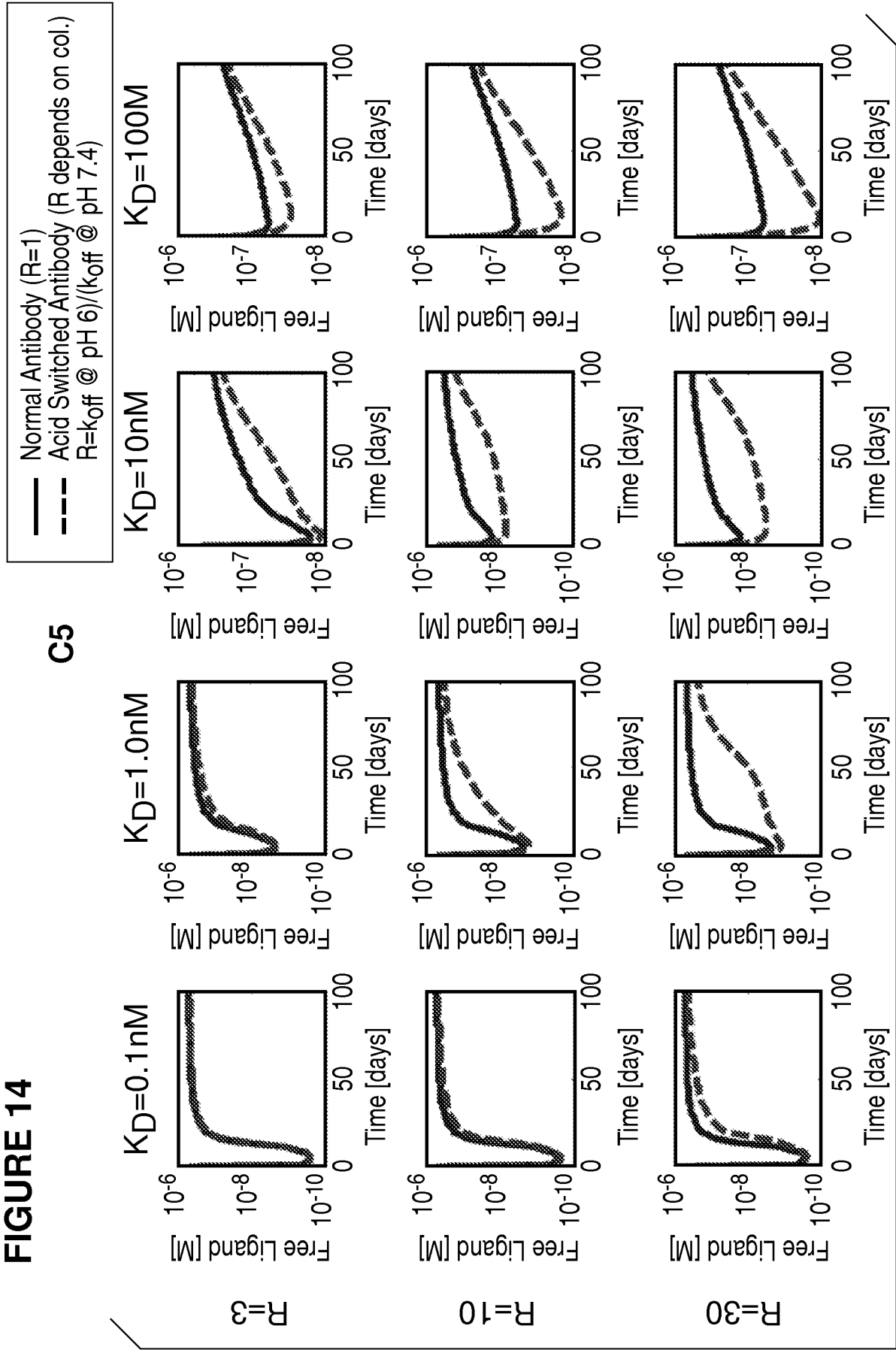
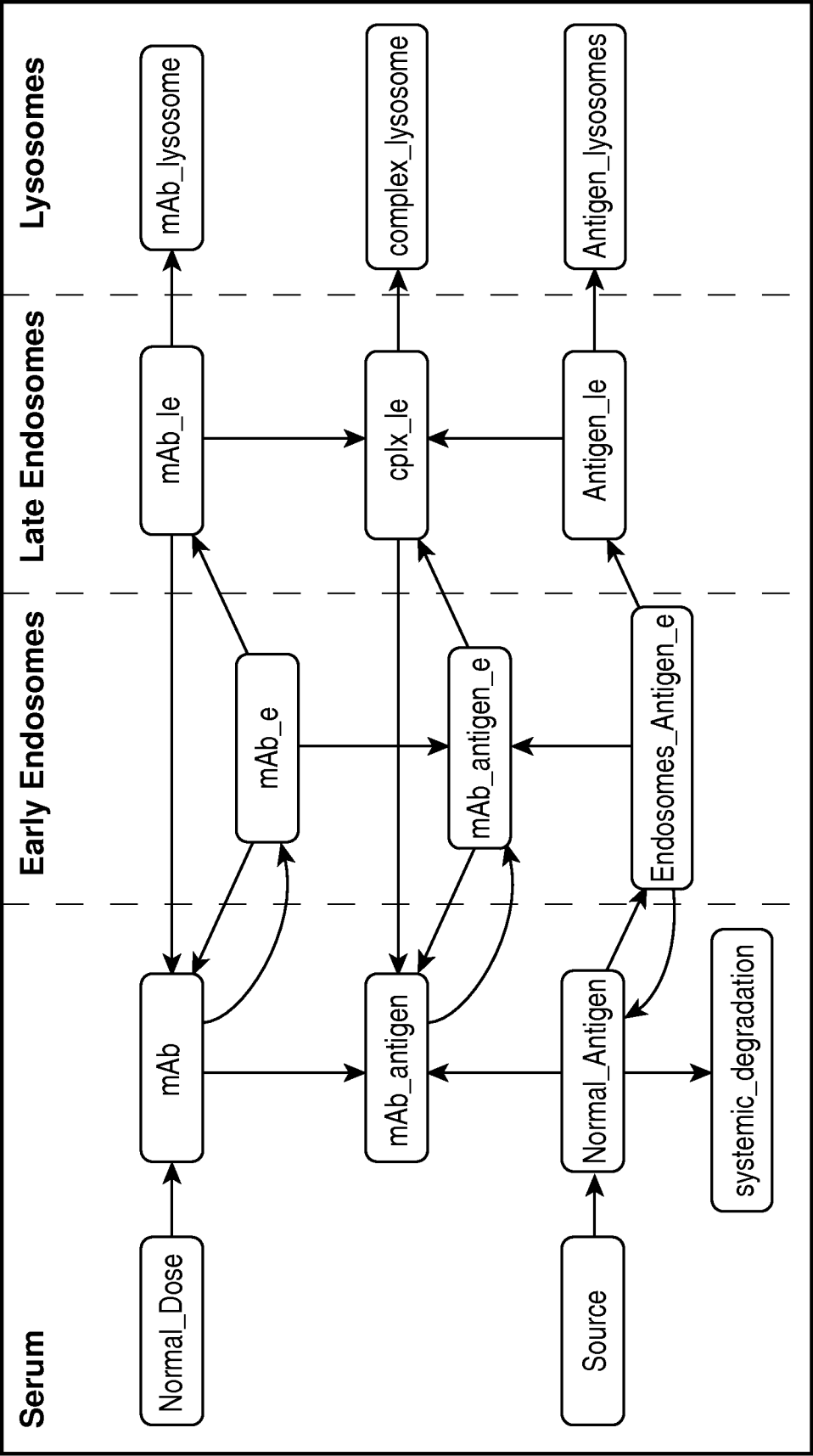


FIGURE 15



Anticuerpos con Unión de Antígenos Dependiente del pH

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a anticuerpos, por ejemplo, los
5 anticuerpos de longitud completa o partes de unión a antígeno de los mismos,
que tienen unión dependiente de pH de tal forma que la proporción de K_D y/o de
 k_{off} a pH endosómico de pH/pH fisiológico (por ejemplo, pH 5,5/pH 7,4 o pH
6,0/pH 7,4) es 2 o mayor.

10 Antecedentes de la invención

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) han llegado a ser importantes
opciones terapéuticas para numerosas enfermedades (Brekke y Sandlie, Nat
Rev Drug Discov 2: 52-62, 2003; Maggon, Curr Med Chem 14: 1978-1987,
2007). La mayoría de los mAb murinos ahora en el mercado son anticuerpos
15 IgG. Su semivida relativamente larga está mediada por unión de FcRn. La
captación de IgG en la célula tiene lugar mediante pinocitosis en fase fluida y la
IgG se une subsiguientemente a FcRn en el ambiente acidificado (pH 6,0) del
compartimento endosómico (Lobo y col., J Pharm Sci 93: 2645-2668, 2004). Se
piensa que IgG unida a FcRn está protegida de la degradación por reciclaje a la
20 superficie celular donde el pH neutro facilita la disociación y la liberación de la
IgG en circulación. La IgG no unida, en contraste, se cree que se transfiere a
los lisosomas y se degrada subsiguientemente (Lencer y Blumberg, Trends Cell
Biol 15: 5-9, 2005).

Recientemente, se han aplicado diversas tecnologías para optimizar la
25 actividad funcional de un anticuerpo IgG introduciendo sustituciones

específicas con el fin de reducir dosis y/o frecuencia de dosis y mejorar la eficacia y la seguridad (Presta, Curr. Opin Immunol 20: 460-470, 2008). Generalmente, la optimización de anticuerpos IgG puede clasificarse en manipular la región constante de Fc, para tener impacto sobre unión de anticuerpo a FcRn, FcγR y el sistema de complemento y en manipular la región variable para tener impacto sobre la afinidad de unión.

Varios trabajos describen la manipulación de la región constante para incrementar la unión a receptores de Fc y potenciar así la función efectora de un anticuerpo IgG1 (Stavenhagen y col., Cancer Res 67: 8882-8890, 2007; Zalevsky y col., Blood 113: 3735-3743, 2009). Se ha mostrado que sustituciones tales como S239D/I332E/A330L o F243L/R292P/Y300L/ en IgG1 mejoran la unión al receptor de Fc IIIa y presentan citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo superior (ADCC) y actividad in vitro superior y eficacia in vivo superior comparadas con la IgG1 de tipo silvestre. Así, en comparación con anticuerpos de tipo silvestre, los anticuerpos con tales sustituciones se espera que muestren eficacia superior a la misma dosis o eficacia comparable a dosis más baja y/o con menor frecuencia de dosificación en el ser humano.

Otro procedimiento para reducir la dosis y/o la frecuencia de dosificación es reducir la eliminación de un anticuerpo IgG. Se comunica que la semivida larga de anticuerpos IgG es dependiente de su unión a FcRn. Por lo tanto, se han estudiado extensamente las sustituciones que aumentan la afinidad de unión de la IgG a FcRn a pH 6,0 manteniendo mientras la dependencia de pH de la interacción manipulando la región constante (Ghetie y col., Nature Biotech. 15: 637-640, 1997; Hinton y col., JBC 279: 6213-6216, 2004;

Dall'Acqua y col., J Immunol 117: 1129-1138, 2006). Sustituciones tales como M428L/N434S, condujeron a semivida incrementada y a un efecto farmacodinámico incrementado en las variantes (Zalevsky y col., Nature Biotech. 28: 157-159, 2010). Varios trabajos han comunicado incremento exitoso en la semivida introduciendo sustituciones tales como T250Q/M428L o M252Y/S254T/T256E para incrementar la unión a FcRn a un pH ácido. En un estudio farmacocinético en primate no humano, la sustitución de T250Q/M428L para IgG1 mostró una semivida de 35 días, un incremento significativo de la semivida de 14 días de IgG1 por encima de la IgG1 de tipo silvestre (Hinton y col., J Immunol 176: 346-356, 2006).

Aunque sustituciones en la región constante son capaces de incrementar significativamente las funciones de anticuerpos IgG terapéuticos, las sustituciones en la región conservada de un modo estricto tienen el riesgo de inmunogenicidad en ser humano (Presta, ant., 2008; De Groot y Martin, Clin Immunol 131: 189-201, 2009) y la sustitución en la secuencia de región variable altamente diversa podría ser menos inmunogénica. Los informes que se refieren a la región variable incluyen manipular los residuos de CDR para mejorar afinidad de unión al antígeno (Rothe y col., Expert Opin Biol Ther 6: 177-187, 2006; Bostrom y col., Methods Mol Biol 525: 353-376, 2009; Thie y col., Methods Mol Biol 525: 309-322, 2009) y manipular los CDR y los restos estructurales para mejorar la estabilidad (Wörn y Plückthun, J Mol Biol 305: 989-1010, 2001; Ewert y col., Methods 34: 184-199, 2004) y disminuir el riesgo de inmunogenicidad (De Groot y Martin, ant., 2009; Jones y col., Methods Mol Bio 525: 405-423, XIV, 2009). Como se indica, se puede lograr afinidad mejorada para el antígeno por maduración de afinidad usando la presentación

de fagos o ribosomas de una biblioteca al azar. Se puede obtener racionalmente estabilidad mejorada a partir de diseño racional basado en secuencia y basado en estructura. El riesgo de inmunogenicidad disminuido (desinmunización) puede llevarse a cabo por diversas metodologías de humanización y por la eliminación de epítomos de células T, lo que se puede predecir usando en tecnologías de sílice o se puede determinar por ensayos in vitro.. Adicionalmente, se han manipulado regiones variables para bajar pI. Se observó una semivida más larga para estos anticuerpos en comparación con anticuerpos de tipo silvestre a pesar de unión de FcRn comparable (Igawa y col., PEDS, Advance Access, doi: 10.1093/protein/gzq009, 2010).

La presente invención se refiere a manipular o a seleccionar anticuerpos con unión de antígenos dependiente de pH para modificar semivida de anticuerpo y/o de antígeno. La semivida de anticuerpo IgG2 se puede acortar si los mecanismos de eliminación mediados por antígenos degradan el anticuerpo cuando está unido al antígeno. De forma similar, el complejo antígeno:anticuerpo puede tener impacto en la semivida del antígeno, bien prolongando la semivida protegiendo el antígeno de los procesos de degradación típicos, o bien acortando la semivida por medio de degradación mediada por anticuerpo. La presente invención se refiere a anticuerpos con afinidad más alta por antígenos a pH 7,4 según se compara con pH endosómico (es decir, pH 5,5-6,0) de tal forma que la proporción K_D a pH 5,5/pH 7,4 o a pH 6,0/pH 7,4 es 2 ó más.

La invención se refiere a un anticuerpo con unión dependiente de pH tal a su antígeno y procedimientos de diseñar, preparar y usar tales anticuerpos. Ejemplos de antígenos objetivo de anticuerpos útiles tales como kexina

subtilisina convertasa proproteína de tipo 9 (PCSK9), también conocida como NARC-1, IgE, proteína relacionada con dickkopf 1 (DKK1), Complemento 5 (C5), esclerostina (SOST) y receptor de GMCSF.

Se ha identificado PCSK9 como una proteína con una mutación genética en algunas formas de hipercolesterolemia familiar. PCSK9 está sintetizada como un zimógeno que sufre procesamiento autocatalítico en un resto particular en el retículo endoplásmico. Estudios de población han mostrado que algunas mutaciones de PCSK9 son de "ganancia de función" y se encuentran en individuos con hipercolesterolemia dominante autosómica, mientras que otras mutaciones de "pérdida de función" (LOF) están ligadas con colesterol reducido en plasma. Estudios de morbilidad y mortalidad en este grupo demostraron claramente que reducir función de PCSK9 disminuyó significativamente el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos con unión dependiente de pH a su antígeno de tal forma que la afinidad de unión al antígeno a pH fisiológico (es decir, pH 7,4) es mayor que a pH endosómico (es decir, pH 6,0 o 5,5). En otras palabras, la proporción de K_D o la proporción de k_{off} a pH 5,5/pH 7,4 o a pH 6,0/pH 7,4 es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, 20, 30, 40, o 100 o más. Tales anticuerpos dependientes de pH se disocian preferencialmente del antígeno en el endosoma. Esto puede incrementar la semivida del anticuerpo, en comparación con los anticuerpos con K_D equivalentes a pH 7,4 pero sin ninguna unión dependiente de pH, cuando el antígeno es uno que sufre la eliminación mediada por antígeno (por ejemplo, PCSK9). Los anticuerpos con unión dependiente de pH pueden disminuir la

semivida de antígeno total cuando el antígeno sufre eliminación reducida cuando se une a anticuerpo (por ejemplo, IL6). Los anticuerpos con unión dependiente de pH también pueden prolongar la disminución mediada por anticuerpo en antígeno que no está unido a anticuerpo. Esto puede ser

5 importante cuando se antagoniza un antígeno objetivo presente típicamente a niveles altos (por ejemplo, IgE, DKK1, C5 y SOST). Además, tales anticuerpos pueden incrementar la semivida de antígeno cuando el antígeno es un receptor y el receptor tiene eliminación incrementada cuando se une a anticuerpo (por ejemplo, receptor de GMCSF). En cualquier realización de la invención

10 descrita a continuación, la K_D y la k_{off} pueden medirse bien a 25°C o bien a 37°C.

En una realización preferida, el anticuerpo con unión dependiente de pH que une específicamente un antígeno con una afinidad más alta a pH 7,4 que a pH 6,0, en el que la proporción de K_D y/o la proporción de k_{off} pH 6,0/pH 7,4 y a

15 25°C es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, o más, y en el que el anticuerpo ha reducido eliminación in vivo de plasma cuando se expone a dicho antígeno según se compara con un anticuerpo sin unión dependiente de pH que tenga una afinidad similar por el antígeno a pH 7,4, pero que tenga una proporción de K_D y/o k_{off} comparable a pH 6,0/pH 7,4 que sea inferior a 2.

20 Preferentemente, el antígeno no es receptor de interleucina-6 (IL6R), o, preferentemente, el anticuerpo no es un anticuerpo Fv3-m73, Fv4-m73 o H3pl/L73 anti-IL6R como se desvela en el documento WO 2010/106812 o el documento WO 2009/041621.

En otra realización preferida, el anticuerpo con unión dependiente de pH

25 que une específicamente un antígeno con una afinidad más alta a pH 7,4 que a

pH 6,0, en el que la proporción de K_D y/o la proporción de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 y a 25°C es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, o más, y en el que el antígeno está tanto unido a membrana como soluble in vivo y en el que el anticuerpo media localización incrementada a un receptor de membrana celular
5 según se compara con un anticuerpo que tenga una afinidad similar por el antígeno a pH 7,4 pero que tenga una proporción comparable de K_D y/o de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 que sea inferior a 2.

Preferentemente, el antígeno no es el IL6R o, preferentemente, el anticuerpo no es un anticuerpo anti-IL6R Fv3-m73, Fv4-m73 o H3pl/L73 como se describe
10 en el documento WO 2010/106812 o en el documento WO 2009/041621. En otra realización preferida, el antígeno es un receptor soluble que es una estructura señuelo no señalizadora. Todavía en otras realizaciones preferidas, el anticuerpo con unión dependiente de pH es un conjugado de fármacos de anticuerpos, media citotoxicidad mediada por células dependiente de
15 anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

La invención incluye un anticuerpo con unión dependiente de pH que se une específicamente a un antígeno con una afinidad más alta a pH 7,4 que a pH 6,0, en el que la proporción de K_D y/o la proporción de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 y a 25°C es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, o más, y en el que el
20 decrecimiento en la cantidad in vivo de anticuerpo no unido a antígeno se prolonga cuando se expone a dicho anticuerpo en comparación con un anticuerpo sin unión dependiente de pH que tenga una afinidad similar por el antígeno a pH 7,4, pero tenga una proporción comparable de K_D y/o de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 que sea menos de 2.

25 La invención proporciona un anticuerpo con unión dependiente de pH

que se une específicamente a un antígeno con una afinidad más alta a pH 7,4 que a pH 6,0, en el que la proporción de K_D y/o la proporción de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 y a 25°C es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, o más, y en el que hay una disminución en la cantidad de anticuerpo unido a antígeno in vivo en
5 comparación con un anticuerpo sin unión dependiente de pH que tenga una afinidad similar por el antígeno a pH 7,4, pero tenga una proporción de K_D y/o de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 y a 25°C que sea menos de 2. En una realización preferida, el antígeno es osteopontina.

La invención también estipula un anticuerpo agonista con unión
10 dependiente de pH que se une específicamente a un antígeno con una afinidad más alta a pH 7,4 que a pH 6,0, en el que la proporción de K_D y/o la proporción de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 y a 25°C es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, o más, y en el que el antígeno es un receptor y el receptor tiene eliminación reducida in vivo cuando se expone a dicho anticuerpo en comparación con un
15 anticuerpo que tenga afinidad similar por el receptor a pH 7,4, pero tenga una proporción comparable de K_D y/o de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 que sea menos de 2. En una realización preferida, el receptor es receptor de GMCSF.

En otras realizaciones preferidas de cualquiera de los anticuerpos precedentes, la proporción de K_D o la proporción de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 es más
20 de, o varía entre, 20, 30, 40 ó 100 o más. En otras realizaciones preferidas, la proporción de K_D o k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 varía entre 2-3, 2-4, 2-8, 2-10, 2-16, o 2-20 ó más, o 3-4, 3-8, 3-10, 3-16 o 3-20, o 4-8, 4-10, 4-16, o 4-20 ó más, u 8 a 10, 8-16, 8-20 ó más, 10-16, 10-20 ó más, o 16-20 o más.

En otras realizaciones preferidas de los anticuerpos previamente
25 descritos, la unión de anticuerpo al antígeno a pH 7,4 y a pH 25°C tiene una K_D

de aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 100 nM, o, más preferentemente, a aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 10 nM.

En otras realizaciones preferidas de los anticuerpos previamente descritos, la unión del anticuerpo al antígeno a pH 7,4 tiene una k_{off} de
5 aproximadamente 1×10^{-4} s⁻¹ a aproximadamente 1×10^{-1} s⁻¹, más preferentemente, de aproximadamente 1×10^{-3} s⁻¹ a aproximadamente 1×10^{-1} s⁻¹.

En otra realización preferida de los anticuerpos descritos previamente, el antígeno es PCSK9. En una realización preferida, el anticuerpo anti-PCSK9 no
10 es el anticuerpo de PCSK9 H1M300N (véase el documento US2010/0166768). En otras realizaciones preferidas, el antígeno es IgE, C5, o DKK1 y, en realizaciones preferidas, la K_D varía entre 1,0 nM a aproximadamente 10 nM o entre 1,0 nM a aproximadamente 100 nM.

La invención también proporciona un procedimiento de prolongar
15 dosificación y/o disminuir la dosis terapéutica para tratar un paciente con un anticuerpo terapéutico, comprendiendo dicho procedimiento administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de cualquiera de los anticuerpos previamente descritos de la invención, en el que dicho anticuerpo tiene un efecto farmacodinámico prolongado y/o una semivida
20 prolongada comparado con un anticuerpo que tenga afinidad similar a pH 7,4, pero que tenga una proporción de K_D y/o una proporción de k_{off} a pH 6,0/7,4 y a 25°C que sea menos de 2.

También está contemplado por la invención un procedimiento de fabricar un anticuerpo con semivida prolongada y/o efecto farmacodinámico por
25 regulación de afinidad de unión de anticuerpos en una manera dependiente de

pH, comprendiendo dicho procedimiento seleccionar para residuos de histidina de CDR de anticuerpos u otros residuos que optimizan el microambiente que afecta a pKa, de tal forma que la unión de antígeno a anticuerpo tiene una proporción de K_D y/o una proporción de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 que es más de, o
5 varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, o más. La invención contempla también anticuerpos elaborados por este procedimiento, incluyendo anticuerpos con 1, 2, 3, 4, 5 ó más sustituciones de histidina en los residuos de CDR que optimizan el microambiente que afecta a pKa.

En una realización preferida del procedimiento descrito anteriormente, el
10 procedimiento comprende además mutagenizar el anticuerpo para lograr afinidad a anticuerpo con una K_D a pH 7,4 de al menos 100 nM como se mide a 25°C. En otra realización, la invención proporciona una biblioteca de anticuerpos enriquecida con histidinas en residuos de CDR u otros residuos que optimizan el microambiente que afecta a pKa.

15 En otras realizaciones preferidas, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a PCSK9 y comprende una región determinante de la complementariedad de región variable de cadena pesada (VH) uno (CDR1), una CDR2 de VH, y una CDR3 de VH de la secuencia de aminoácidos de VH mostrada en SEC ID N.º: 4 ó 5 o una variante de las
20 mismas que tenga una, dos, tres o más sustituciones de aminoácidos conservadoras en CDR1, CDR2, y/o CDR3.

En una realización preferida, el anticuerpo comprende adicionalmente la CDR1, la CDR2 y la CDR3 de la región variable de cadena ligera (VL) de la secuencia de aminoácidos de VL mostrada en SEC ID N.º: 3 o una variante de
25 la misma que tenga una, dos, tres o más sustituciones conservadoras de

aminoácidos en CDR1, CDR2, y/o CDR3.

La invención también estipula anticuerpo aislado que se une específicamente a PCSK9 y comprende una región determinante de complementariedad de región variable de cadena pesada (VH) uno (CDR1) que
5 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º: 6 , una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º: 7 , y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º.: 8, o una variante de las mismas que tenga una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos en CDR1, CDR2, y/o CDR3, así como un
10 anticuerpo aislado que se une específicamente a PCSK9 y comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º: 6 , una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º: 7 , y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º: 9 , o una variante de las mismas que tenga una, dos, tres o más
15 sustituciones conservadoras de aminoácidos en CDR1, CDR2, y/o CDR3.

En una realización adicional, la invención contempla un anticuerpo aislado que comprende una región variable de cadena ligera CDR1 (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º: 10, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º: 11, y/o
20 CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º: 12 , o una variante de las mismas que tienen uno, dos, tres o más sustituciones conservadoras de aminoácidos en CDR1, CDR2, y/o CDR3.

En realizaciones preferidas de lo anterior, el anticuerpo comprende adicionalmente una VL de CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos
25 mostrada en SEC ID N.º: 10 , una CDR2 de VL que tiene la secuencia de

aminoácidos mostrada en SECID N.º: 11, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º: 12 , o una variante de las mismas que tienen uno, dos, tres o más sustituciones conservadoras de aminoácidos en CDR1, CDR2, y/o CDR3, preferentemente, la región VH
5 comprende SEC ID N.º: 4 o SEC ID N.º: 5 y la región VL comprende SEQ ID N.º: 3, o una variante de las mismas que tienen uno, dos, tres o más sustituciones conservadoras de aminoácidos en la SEC ID N.º: 4, SEC ID N.º: 5 y/o SEC ID N.º: 3.

En otra realización preferida de los anticuerpos de PCSK9 de la
10 presente invención, el anticuerpo tiene una o más mutaciones de Fc, preferentemente, N434S, N434H, mutante doble M428L-N434H, mutante doble M428L-N434A, mutante doble T250Q-M428L, y mutante doble M428L-N434S.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, codificada por los plásmidos depositados en la
15 ATCC y que tiene N.º de Acceso de ATCC PTA-10547, o PTA-10548, y/o PTA-10549.

También están contempladas por la invención composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, una célula huésped que
20 recombinantemente produce el anticuerpo de cualquiera de los anticuerpos descritos previamente, un ácido nucleico aislado que codifica cualesquiera anticuerpos descritos previamente y un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos previamente descritos.

También está contemplado por la invención un procedimiento para
25 reducir un nivel de LDL-colesterol en sangre de un sujeto en necesidad del

mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los anticuerpos de la invención dirigido a antígeno PCSK9.

5 Descripción Breve de las Figuras/Dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra el incremento en la concentración de anticuerpo a lo largo del tiempo como una función de la proporción de K_D .

Figura 2 es una gráfica que muestra la disminución en ligando libre (antígeno) a lo largo del tiempo como una función de la proporción de K_D .

10 Figura 3 es una gráfica que muestra el efecto de cambiar k_{off} y k_{on} en la concentración de anticuerpo a lo largo del tiempo.

La figura 4 es una presentación de mapa de calor que muestra cuantos días más un anticuerpo con unión dependiente de pH suero podría disminuir concentración de antígeno como una función de K_D (R), semivida en suero de
15 antígeno y concentración sérica de antígeno. R es equivalente a la proporción de K_D a pH endosómico frente a pH fisiológico.

La figura 5 valida la predictibilidad del modelado de anticuerpos dependiente de pH. El modelo predijo exitosamente la concentración de anticuerpo total para 5A10 (Figura 5A). La figura 5B es una gráfica que
20 demuestra el efecto del curso temporal de 5A10 en LDL.

La figura 6 también valida la predictibilidad del modelado de anticuerpos dependiente de pH. El modelo predijo exitosamente la concentración de anticuerpo total para 5L1721H23_6L3H3 (6L3H3) (Figura 6A). La figura 6B es una gráfica que demuestra el efecto del curso temporal de 6L3H3 en LDL. El
25 anticuerpo de unión dependiente de pH 6L3H3 prolongó el intervalo en el que

LDL estuvieron disminuyendo en comparación con 5A10.

La figura 7 muestra el curso temporal del efecto de colesterol total cuando se administran diversos anticuerpos de PCSK9. La figura 7A muestra el efecto dependiente de dosis de 5A10 en colesterol total. La figura 7B muestra el efecto dependiente de dosis de anticuerpo dependiente de pH 5L1721H23 _ 6H3. Este efecto se prolonga en comparación con el efecto de 5A10.

La figura 8 es una gráfica que muestra que los anticuerpos con unión dependiente de pH, 5L1721H23 _6H3 y 5L1721H23 _ 6L3H3, tienen degradación de anticuerpo reducida y una semivida prolongada comparados con anticuerpos sin unión dependiente de pH. La figura 8B es una gráfica que demuestra que el efecto mostrado en la Figura 8A se debe a degradación mediada por objetivo. La degradación de anticuerpo en ratones con PCSK9 anulado aumenta espectacularmente tras la inyección de PCSK9.

La figura 9 es una gráfica que ilustra el efecto de anticuerpos antagonistas de PCSK9 sensibles a pH y de anticuerpos antagonistas de PCSK9 no sensibles a pH en los niveles de colesterol en ratones. Mientras que no se detectó cambio espectacular en niveles de HDL (Figura 9A), los anticuerpos sensibles a pH mediaron una reducción más prolongada en niveles de LDL comparados con anticuerpo L1L3 no dependiente de pH.

La figura 10 es una gráfica que demuestra que los anticuerpos PCSK9 con unión dependiente de pH tienen una semivida in vivo prolongada comparada con los anticuerpos no dependientes de pH.

La figura 11 es un mapa de calor que muestra el mapa de modelado general para unión dependiente de pH. Tales anticuerpos dirigidos contra

antígenos DKK1, IgE, o C5, pueden incrementar significativamente el número de días que el antígeno experimentó niveles reducidos de antígeno comparado con un anticuerpo sin unión dependiente de pH.

La figura 12 modela el curso temporal para concentración de antígeno tras la administración de un anticuerpo con unión dependiente de pH dirigido contra antígeno IgE.

La figura 13 modela el curso temporal para la concentración de antígeno tras la administración de un anticuerpo con unión dependiente de pH dirigido contra antígeno DKK1 .

La figura 14 modela el curso temporal para la concentración de antígeno después de administración de un anticuerpo con unión dependiente de pH dirigido contra antígeno C5.

La figura 15 detalla el modelo de tráfico para anticuerpos con unión dependiente de pH usado para modelar.

15 Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se refiere a anticuerpos con unión dependiente de pH a su antígeno de tal forma que la afinidad de unión al antígeno a pH fisiológico (es decir, pH 7,4) es mayor que a pH endosómico (es decir, pH 6,0 o 5,5). En otras palabras, la proporción de K_D o k_{off} a pH 5,5/pH 7,4 o a pH 6,0/pH 7,4 es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, 20, 30, 40, o 100 o más. Tales anticuerpos dependientes de pH se disocian preferencialmente del antígeno en el endosoma. Esto puede incrementar semivida de anticuerpos en la circulación, en comparación con los anticuerpos con equivalente K_D a pH 7,4 pero sin ninguna unión dependiente de pH, cuando el antígeno es uno que sufre la eliminación mediada por antígeno (por ejemplo, PCSK9). Los

- anticuerpos con unión dependiente de pH pueden disminuir la semivida del antígeno total promedio cuando el antígeno sufre eliminación reducida cuando se une a anticuerpo (por ejemplo, IL6). Los anticuerpos con unión dependiente de pH también pueden prolongar la disminución en antígeno que no está unido a anticuerpo. Esto puede ser importante cuando se antagoniza un antígeno objetivo presente típicamente a niveles altos (por ejemplo, IgE, DKK1, C5 y SOST). Además, tales anticuerpos pueden incrementar semivida de antígeno cuando el antígeno es un receptor y el receptor ha incrementado la eliminación cuando está unido a anticuerpo (por ejemplo, receptor de GMCSF).
- 10 Si el antígeno media degradación mediada por objetivo, después usar después tales anticuerpos con unión dependiente de pH para lograr disociación en el endosoma puede incrementar el efecto farmacodinámico del anticuerpo, por ejemplo, cuando el antígeno sufre la eliminación mediada por objetivo (por ejemplo, PCSK9). El anticuerpo con unión dependiente de pH se disocia del
- 15 antígeno, se escapa de degradación mediada por antígeno, puede reciclarse fuera de la célula por medio de unión de FcRn y tendrá una semivida más larga que un anticuerpo con K_D similar a pH 7,4 pero sin ninguna unión dependiente de pH.
- Usar tales anticuerpos con unión dependiente de pH es también útil
- 20 terapéuticamente cuando el antígeno soluble está presente a concentración alta (por ejemplo, IgE, C5, DKK1, o SOST). Después de disociación del antígeno en el endosoma y de degradación de antígeno en la lisozima, el anticuerpo puede reciclarse en el plasma para unir antígeno libre adicional, puede prolongar la disminución en antígenos no unidos a anticuerpos, y puede
- 25 disminuir la dosis terapéutica requerida, en comparación con un anticuerpo con

K_D similar a pH 7,4 pero sin unión dependiente de pH.

Adicionalmente, usar anticuerpos con unión dependiente de pH puede ser útil cuando el antígeno está presente unido en membrana así como en forma soluble, por ejemplo, un receptor, y se desea para potenciar a la forma unida a membrana. Disociando a partir de la forma soluble, el anticuerpo tiene la oportunidad incrementada para re-unirse a la forma de membrana, incrementando el anticuerpo en proximidad a la membrana celular. Si unido a la membrana toma forma en una manera divalente, la afinidad efectiva puede ser más alta, o la velocidad de disociación efectiva puede ser más baja, por el efecto de avidéz.

Esto tiene aplicación para usar conjugados anticuerpo-fármaco (CAF) cuando se toma como objetivo un antígeno presente tanto en forma unida a membrana como en forma soluble. En células que contienen FcRn en el endotelio, los antígenos solubles se eliminarían con el CAF reciclándose al compartimento de plasma teniendo en cuenta oportunidad para unirse a antígeno unido a membrana. Con anticuerpos con unión dependiente de pH, la unión incrementada a la forma de membrana enlazada, bien divalentemente o bien monovalentemente, causará la internalización de anticuerpos incrementada con el antígeno unido a membrana y muerte celular. Si se une al receptor en una forma divalente, la avidéz puede incrementar la afinidad efectiva eficaz o puede ralentizar la velocidad de disociación efectiva.

El mecanismo por CCDA y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) también se pueden explotar en usar anticuerpos con unión dependiente de pH. En células que contienen FcRn en el endotelio, el antígeno soluble se aclarará y el CAF se reciclará al compartimento de plasma, teniendo en cuenta

la oportunidad de unir antígeno unido a membrana. Liberar los anticuerpos del receptor soluble incrementará el anticuerpo libre disponible que podrá unirse después a antígeno unido a membrana e incrementará matanza celular.

5 Técnicas Generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo células recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la habilidad en la técnica. Tales técnicas se explican

10 completamente en la bibliografía, tal como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook y col., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to

15 Cell and Tissue Culture (J.P. Biol. y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y

20 P.F. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis y col., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan y col., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Coligan y col., Janeway Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies:

25 a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal

antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow y D. Carril (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

5

Definiciones

Un “anticuerpo” es una molécula de inmunoglobulina capaz de unión específica a un objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término abarca no sólo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también cualquier fragmento de unión a antígeno de los mismos (es decir, “parte de unión a antígeno”) o de cadena simple de los mismos, las proteínas de condensación que comprenden un anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno, incluyendo, por ejemplo sin limitación, cadena sencilla (scFv) y anticuerpos de dominio (por ejemplo, anticuerpos de dominio humanos, de camélidos o de tiburones), maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, vNAR y bis-scFv (véase por ejemplo, Hollinger y Hudson, Nature Biotech 23: 1126-1136, 2005). Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA, o IgM (o subclase de los mismos), y el anticuerpo no es necesario que sea de cualquier clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, se pueden asignar las inmunoglobulinas a diferentes clases:

10

15

20

25

Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varios de éstos pueden además dividirse en “subclases” (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

El término “parte de unión de antígenos” de un anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que retiene(n) la capacidad de unir específicamente a un antígeno dado (por ejemplo, objetivo X). Las funciones de unión de antígeno de un anticuerpo se pueden llevar a cabo por fragmentos de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro del término “parte de unión de antígenos” de un anticuerpo incluyen Fab, Fab’, F(ab’)₂, un fragmento Fd constituido por los dominios VH y CH1, un fragmento Fv constituido por los dominios VL y VH de un brazo individual de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de dominio sencillo (dAb) (Ward y cols., Nature 341: 544-546, 1989), y una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

Como se usa en el presente documento, la “CDR” puede definirse de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat, de Chothia, extendida, de AbM, de contacto, y/o conformacional. La identidad de los residuos aminoacídicos en un anticuerpo particular que conforman una CDR puede determinarse usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las CDR de un anticuerpo pueden identificarse como regiones

hipervariables definidas originariamente por Kabat y col. Véase E.A. Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Las posiciones de las CDR también pueden definirse como las estructuras de bucles estructurales que describieron originariamente Chotia y otros. Véase, por ejemplo, Chothia y col., *Nature* 342: 877-883, 1989. Otras estrategias de identificación de CDR incluyen la “definición de AbM,” que está a medio camino entre Kabat y Chotia y se deriva usando el software de modelado de anticuerpos Oxford Molecular's AbM (actualmente Accelrys ®), o la “definición de contacto” de las CDR en base a los contactos de antígenos observados, expuesta en MacCallum y col., *J. Mol. Biol.* 262: 732-745, 1996. En otra aproximación, referida en el presente documento como la “definición conformacional” de las CDR, las posiciones de las CDR pueden identificarse como los residuos que hacen contribuciones entálpicas a la unión a antígenos. Véase, por ejemplo, Makabe y col., *Journal of Biological Chemistry*, 283: 1156-1166, 2008. Todavía otras definiciones límite pueden no seguir estrictamente una de las aproximaciones anteriores, pero no obstante se solaparán con al menos una parte de CDR de Kabat, aunque pueden puede acortarse o alargarse a la luz de predicción o de hallazgos experimentales de que residuos o grupos de residuos o incluso CDR enteros no tienen impacto significativamente en unión a antígenos. Como se usa en el presente documento, un CDR puede referirse a CDR definido por cualquier aproximación conocida en la técnica, incluyendo combinaciones de aproximaciones.

Como se usa en el presente documento, la expresión “anticuerpo monoclonal”, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de

anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por posibles mutaciones, por ejemplo mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante individual sobre un antígeno. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se puede interpretar como producción requerida del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usarse de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el procedimiento de hibridoma descrito primeramente por Kohler y Milstein, 1975, Nature 256: 495, o pueden fabricarse mediante procedimientos de ADN recombinante tal como se describe en la Patente de los E.E.U.U. N.º: 4,816,567. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de colecciones de fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., 1990, Nature 348: 552-554, por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, anticuerpos "humanizados" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos), anticuerpos que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas, o fragmentos de los mismos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana.

Preferentemente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor están reemplazados por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, o conejo que tengan la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias importadas de CDR o las secuencias estructurales importadas, pero están incluidos para refinar y optimizar la actuación del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los al menos uno y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una parte de una región o dominio constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Se prefieren anticuerpos que tienen regiones Fc modificadas como se describen en el documento WO 99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2 y/o CDR H3) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, que se denominan también una o más CDR “derivadas de” una o más CDR del anticuerpo original.

Como se usa en el presente documento, “anticuerpo humano”

quiere decir un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a aquella de un anticuerpo que se pueden producir por un ser humano y/o que se ha elaborado usando cualquiera de las técnicas para elaborar anticuerpos humanos conocidas por aquellos expertos en la técnica o

5 descritas en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada humano o al menos un polipéptido de cadena ligera humano. Un ejemplo tal es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y cadena pesada humana. Los anticuerpos humanos pueden producirse

10 usando diversas técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona a partir de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col., 1996, Nature Biotechnology, 14: 309-314; Sheets y cols., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 95: 6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227: 381;

15 Marks y col., 1991, J. Mol. Biol., 222: 581). Los anticuerpos humanos pueden también fabricarse mediante inmunización de animales dentro de los que los loci de inmunoglobulina humana se han introducido transgénicamente en lugar de los loci endógenos, por ejemplo, los ratones en los que los genes de inmunoglobulinas endógenas están parcialmente o completamente inactivados.

20 Esta técnica se describe en las Patentes de EE.UU. N.^{os}: 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016. Alternativamente, el anticuerpo humano se puede preparar mediante linfocitos B humanos que se immortalizan que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno objetivo (linfocitos B tales que pueden recuperarse de un individuo o que pueden haber

25 sido inmunizados in vitro). Véase, por ejemplo, Cole y col. Monoclonal

Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77, 1985; Boerner y col., 1991, J. Immunol., 147 (1): 86-95; y la Patente de EE.UU. N.º: 5,750,373.

Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, bien solas o bien en combinación. Como se conoce en la técnica, las regiones variables de la cadena pesada y ligera cada constan cada una de cuatro regiones estructurales (FR) conectadas por tres regiones de determinación de complementariedad (CDR) que contienen regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen conjuntamente en proximidad cercana por las FR y, con las otras CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos. Hay al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) una aproximación en base a variabilidad de secuencia entre especies cruzada (es decir, Kabat y col. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) una aproximación en base a estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani y col., 1997, J. Molec. Biol. 273: 927-948). Como se usa en el presente documento, una CDR se puede referir a CDR definidas bien por aproximación o por una combinación de ambas aproximaciones.

Como se conoce en la técnica una “región constante” de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, bien solas o bien en combinación.

Como se usa en el presente documento, el término “PCSK9” se refiere a cualquier forma de PCSK9 y a variantes de la misma que conserven al menos

parte de la actividad de PCSK9. A menos que se indique de forma diferente, tal como por una referencia específica a PCSK9 humana, PCSK9 incluye todas las especies de mamíferos PCSK9 de secuencia nativa, por ejemplo, humanas, caninas, felinas, equinas y bovinas. Una PCSK9 humana ejemplar se encuentra como Número De Acceso Uniprot Q8NBP7 (SEC ID N.º: 16).

Tal como se usa en el presente documento, un “anticuerpo antagonista de PCSK9” se refiere a un anticuerpo que es capaz de inhibir actividad biológica de PCSK9 y/o de inhibir más adelante en la(s) ruta(s) mediadas por señalización de PCSK9, incluyendo regulación a la baja del LDLR mediada por PCSK9 y disminución mediada por PCSK9 en eliminación en sangre de LDL. Un anticuerpo antagonista de PCSK9 dependiente de pH comprende anticuerpos que bloquean, antagonizan, suprimen o reducen (incluyendo significativamente a cualquier grado) actividad biológica de PCSK9, incluyendo anticuerpos que bloquean, antagonizan, suprimen o reducen rutas de señalización mediadas más adelante por PCSK9, tales como interacción de LDLR y/o provocación de respuesta celular a PCSK9. Para el propósito de la presente invención, se entenderá explícitamente que el término “anticuerpo antagonista de PCSK9” engloba todos los términos, títulos y estados funcionales y características previamente identificados por los que PCSK9 en sí, una actividad biológica de PCSK9 (incluyendo pero no limitadas a su capacidad para mediar cualquier aspecto de la interacción con el LDLR, regulación a la baja de LDLR, y eliminación a la baja de LDL), o las consecuencias de la actividad biológica, son sustancialmente anulados, disminuidos, o neutralizados en cualquier grado significativo. En algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista de PCSK9 dependiente de pH se une

a PCSK9 y evita la interacción con el LDLR. Ejemplos de anticuerpos antagonistas de PCSK9 se proporcionan en el presente documento.

Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" se usan intercambiabilmente en el presente documento para referirse a cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, preferentemente, relativamente corta (por ejemplo, 10-100 aminoácidos). La cadena pueden ser lineal o ramificada, puede comprender aminoácidos modificados y/o puede interrumpirse por no aminoácidos. Los términos también abarcan una cadena de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente marcador. También están incluidos dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que los polipéptidos pueden aparecer como cadenas individuales o como cadenas asociadas.

Como se conoce en la técnica, "polinucleótido," o "ácido nucleico," tal como se usan intercambiabilmente en el presente documento, se refieren a cadenas de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar dentro de una cadena por polimerasa de ADN o de ARN. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación para la

estructura de nucleótidos puede impartirse antes o después de ensamblaje de la cadena. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de polimerización, tal como por conjugación con un

5 componente marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “caperuzas”, la sustitución de uno o más de los nucleótidos que se dan en la naturaleza por un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por

10 ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas que contienen restos laterales, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, las nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellas con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos,

15 etc.), aquellas que contienen alquilantes, aquellas con enlaces no modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.), así como formas no modificadas del/de los polinucleótido(s). Adicionalmente, cualesquiera de los grupos hidroxilo de ordinario presentes en los azúcares se pueden reemplazar, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, se pueden proteger por

20 grupos protectores estándar, o se pueden activar para preparar enlaces a nucleótidos adicionales, o se pueden conjugar a soportes sólidos. Los OH terminales de 5' y de 3' OH pueden estar fosforilados o pueden estar sustituidos con aminas o con restos de grupos caperuza orgánicos desde 1 hasta 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a

25 grupos protectores estándar. Los polinucleótidos pueden contener también

formas análogas de azúcares de ribosa o de desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares alfa- o beta-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, 5 azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleosídicos tales como ribósido de metilo. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden estar reemplazados por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que el fosfato es reemplazado por P(O)S ("tioato"), P(S)S 10 ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o insustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los 15 polinucleótidos referidos en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferencialmente" a un objetivo si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración de lo que se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente o preferencialmente a un epítipo de PCSK9 es un 20 anticuerpo que se une a este epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con duración mayor de lo que se une a otros epítipos de PCSK9 o no epítipos de PCSK9. Se entiende también leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que específicamente se une o preferencialmente se une a un primer objetivo puede o no puede unirse 25 específicamente o preferencialmente a una segunda diana. Como tal, la "unión

específica” o la “unión preferencial” no necesariamente requiere (aunque se pueda incluir) la unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la unión quiere decir unión preferencial.

Un “señuelo no señalizador” es una isoforma de receptor soluble o una
5 proteína de unión que secuestra ligando de el/los receptor(es) conocido(s).

Como se usa en el presente documento, “sustancialmente puro” se refiere a material que es al menos puro (es decir, libre de contaminantes) al 50%, más preferentemente, al menos puro al 90%, más preferentemente, al menos puro al 95%, aún más preferentemente, al menos puro al 98%, y lo más
10 preferentemente, al menos puro al 99%.

Una “célula huésped” incluye una célula individual o un cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor para vector(es) para incorporación de insertos de polinucleótidos. Las células huésped incluyen la progenie de una única célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente
15 completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula progenitora original debido a mutación natural, accidental o derivada. Una célula huésped incluye células transfectadas in vivo con un polinucleótido/con polinucleótidos de esta invención.

Como se conoce en la técnica, el término “región Fc” se usa para definir
20 una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La “región Fc” puede ser una secuencia nativa de la región Fc o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define usualmente extendiéndose a partir de un residuo aminoacídico en la posición
25 Cys226, o Pro230, hasta el extremo carboxilo de la misma. La numeración de

los residuos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. La región Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, CH2 y
5 CH3.

Tal como se usa en la técnica, "receptor de Fc" y "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las
10 subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente ajustadas de estos receptores. Los receptores de FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. Los FcR se revisan en Ravetch y
15 Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9: 457-92; Capel y col., 1994, Immunomethods, 4: 25-34; y de Haas y col., 1995, J. Lab. Clin. Med., 126: 330-41. "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer y col., 1976 J. Immunol., 117: 587; y Kim y col., 1994, J. Immunol., 24: 249).

20 El término "competir", como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, quiere decir que un primer anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, se une a un epítipo en una manera suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo, o de una parte de unión a antígeno del mismo, de tal forma que el resultado de unión del primer
25 anticuerpo con su epítipo cognado está disminuido de forma detectable en

presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, donde la unión del segundo anticuerpo a su epítopo también está disminuida de forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede ser el caso, pero no necesariamente es el caso. Es decir, un primer anticuerpo pueden inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítopo sin que el segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su respectivo epítopo. Sin embargo, donde cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítopo o ligando cognado, sea en la misma, mayor, o menor medida, los anticuerpos se dice que “compiten de forma cruzada” unos con otros para unión con su(s) respectivo(s) epítopo(s). Tanto los anticuerpos competidores como los anticuerpos que compiten de forma cruzada están comprendidos por la presente invención. Sin tener en cuenta el mecanismo por el que tiene lugar dicha competición o competición cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional, o unión a un epítopo común, o a parte del mismo), el trabajador experto apreciaría, basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que tales anticuerpos competidores y anticuerpos de competición cruzada están comprendidos por y pueden ser útiles para los procedimientos revelados en el presente documento.

Una “región de Fc funcional” posee al menos una función efectora de una secuencia nativa de la región Fc. Las “funciones efectoras” ejemplares incluyen unión a C1q; CDC; unión de receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo; fagocitosis; regulación a la baja de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptores de linfocitos B), etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región de Fc se

combine con un dominio de unión (por ejemplo, un anticuerpo de dominio variable) y se pueda evaluar usando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpos.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región de Fc encontrada en la naturaleza. Una “región de Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de aquella de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, retiene aún al menos una función efectora de la región de Fc de secuencia nativa. Preferentemente, la región de Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región de Fc de secuencia nativa o con una región de Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente, de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región de Fc de secuencia o en la región de Fc del polipéptido parental. La región de Fc variante en el presente documento poseerá preferentemente al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia con una región de Fc de secuencia nativa y/o con una región de Fc de un polipéptido parental, y lo más preferentemente, al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia con las mismas, más preferentemente, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con las mismas.

Por “Nivel de Efecto Biológico Anticipado Mínimo (MABEL)” se quiere

decir el nivel de dosis anticipado mínimo que conduce a un efecto biológico mínimo en seres humanos. Los factores de seguridad se aplican usualmente para el cálculo para la primera dosis en el hombre de MABEL. El cálculo de MABEL debería utilizar toda la información de farmacocinética y de
5 farmacodinámica in vitro e in vivo relevante.

Como se usa en el presente documento, “tratamiento” y “terapéuticamente efectivo” son aproximaciones para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los propósitos de esta invención relacionados con anticuerpos antagonistas de PCSK9 dependientes de pH, los
10 resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: potenciación de eliminación de LDL y reducción de incidencia o mejora de colesterol aberrante y/o niveles de lipoproteínas resultantes de trastornos metabólicos y/o trastornos alimenticios, o incluyendo hipercolesterolemia familiar, dislipidemia aterogénica, aterosclerosis, y, más
15 generalmente, enfermedad cardiovascular (CVD).

“Reducir incidencia” quiere decir cualquier forma de reducir gravedad (que puede incluir reducir necesidad de y/o cantidad de (por ejemplo, exposición a) otros fármacos y/o terapias) usada generalmente para esta afección. Tal como se entiende por aquellos expertos en la técnica, los
20 individuos pueden variar en términos de su respuesta al tratamiento y, como tal, por ejemplo, un “procedimiento para reducir incidencia” refleja administrar el anticuerpo dependiente de pH en base a una expectativa razonable de que tal administración pueda probablemente causar una reducción tal en la incidencia en ese individuo en particular.

25 “Mejorar” quiere decir una disminución o mejora de uno o más síntomas

después de administrar un tratamiento en comparación con no administrar un tratamiento. "Mejorar" también incluye acortamiento o reducción en la duración de un síntoma.

Como se usa en el presente documento, un "dosificación efectiva" o

5 "cantidad eficaz" de fármaco, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para afectar uno o más resultados beneficiosos o deseados cualesquiera. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retardar la aparición de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o

10 comportamentales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico de un anticuerpo antagonista de PCSK9 dependiente de pH, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como reducir hipercolesterolemia o uno o más síntomas de

15 dislipidemia, aterosclerosis, CVD, o enfermedad cardíaca coronaria, disminuir la dosis de otras medicaciones requeridas para tratar la enfermedad, potenciar el efecto de otra medicación, y/o retrasar la progresión de la enfermedad de los pacientes. Una dosificación efectiva se puede administrar en una o más administraciones. Para los propósitos de esta invención, una dosificación

20 efectiva de fármaco, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para llevar a cabo tratamiento profiláctico o terapéutico bien directamente o bien indirectamente. Tal como se entiende en el contexto clínico, una dosificación efectiva de un fármaco, compuesto, o composición farmacéutica puede o no puede lograrse en conjunción con otro fármaco,

25 compuesto, o composición farmacéutica. Así, una "dosificación efectiva" se

puede considerar en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos y un agente individual se puede considerar que se da en una cantidad eficaz si, junto con uno o más de otros agentes, se puede lograr o se logra un resultado deseable.

- 5 Un "individuo" o un "sujeto" es un mamífero, más preferentemente, un ser humano. Los mamíferos también incluyen, pero no se limitan a, animales de granja, animales deportivos, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas.

- Como se usa en el presente documento, "vector" significa una
10 construcción, que es capaz de suministrar, y, preferentemente, expresar uno o más gene(s) o secuencia(s) de interés en una célula huésped. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores víricos, vectores de expresión de ADN desnudo o de ARN desnudo, vectores de plásmidos, de cósmidos o de fagos, vectores de expresión de ADN o de ARN asociados con agentes de
15 condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o de ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucariotas, tales como células productoras.

- Como se usa en el presente documento, "secuencia de control de expresión" quiere decir una secuencia de ácidos nucleicos que dirige la
20 transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o un promotor inducible, o un potenciador. La secuencia de control de expresión se une de manera operable a la secuencia de ácidos nucleicos a transcribirse.

- Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente
25 aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier

material que, cuando se combina con un ingrediente activo, permite al ingrediente retener actividad biológica y es no reactivo con el sistema inmune del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite en agua, y diversos tipos de agentes humectantes. Diluyentes preferentes para aerosol o administración parenteral son solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina normal (NaCl al 0,9%). Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan por procedimientos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; y Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, Mack Publishing, 2000).

El término " k_{on} ", como se usa en el presente documento, se refiere a la velocidad constante para asociación de un anticuerpo a un antígeno. Específicamente, las constantes de velocidad (k_{on} y k_{off}) y las constantes de disociación en el equilibrio se miden usando fragmentos de anticuerpo Fab (es decir, univalentes) y antígeno.

El término " k_{off} ", como se usa en el presente documento, se refiere a la velocidad constante para disociación de un complejo antígeno/anticuerpo.

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

Determinaciones de las constantes de velocidad de asociación y disociación, k_a y k_d respectivamente, para determinar proporciones de K_D y k_{off} , se hacen usando un biosensor basado en resonancia de plasmón superficial

para caracterizar una interacción analito/ligando en condiciones en las que el analito es monovalente con respecto a la unión de un ligando que está inmovilizado a baja capacidad sobre una superficie del sensor por medio de un reactivo de captura. El análisis se lleva a cabo usando metodología de valoración cinética como se describe en Karlsson y col., *Anal. Biochem* 349, 136-147, 2006. El chip sensor, el reactivo de captura, y el tampón de ensayo empleados para un ensayo se eligen para dar captura de forma estable a ligando sobre la superficie del sensor, para minimizar unión no específica del analito a las superficies y para producir las respuestas de unión a analito que son apropiadas para análisis cinético, por las recomendaciones en Myszka, J. *Mol. Recognit* 12, 279-284, 1999. Las respuestas de unión a analito por interacción de analito/ligando están referidas de forma doble y se ajustan a un "modelo limitado de transporte de masas" de Langmuir 1:1 con k_a , k_d y $R_{m\acute{a}x}$ como parámetros a nivel mundial según se describen en Myszka & Morton y col., *Biophys. Chem* 64, 127-137 (1997). La constante de disociación en el equilibrio, K_D , se deduce a partir de la proporción de las constantes de velocidad cinética, $K_D = k_d/k_a$. Tales determinaciones tienen lugar preferentemente a 25°C o a 37°C.

20 A. Procedimientos para evitar o tratar trastornos

En un aspecto con respecto a anticuerpos antagonistas de PCSK9 dependientes de pH, la invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir hipercolesterolemia, y/o al menos un síntoma de dislipidemia, aterosclerosis, CVD o enfermedad cardíaca coronaria, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de un anticuerpo

antagonista de PCSK9 dependiente de pH que antagoniza PCSK9 circulante.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una cantidad efectiva de un anticuerpo antagonista de PCSK9 dependiente de pH que antagoniza PCSK9 circulante para usar en tratar o prevenir hipercolesterolemia, y/o al menos un síntoma de dislipidemia, aterosclerosis, CVD o enfermedad cardíaca coronaria, en un individuo. La invención además proporciona el uso de una cantidad efectiva de un anticuerpo antagonista de PCSK9 dependiente de pH que antagoniza PCSK9 extracelular o circulante en la elaboración de un medicamento para tratar o prevenir hipercolesterolemia, y/o al menos un síntoma de dislipidemia, aterosclerosis, CVD o enfermedad cardíaca coronaria, en un individuo.

Ventajosamente, la administración terapéutica del anticuerpo da como resultado colesterol en sangre más bajo y/o LDL en sangre más bajas. Preferentemente, el colesterol en sangre y/o las LDL en sangre son al menos aproximadamente el 10% o el 15% más bajos que antes de su administración. Más preferentemente, el colesterol en sangre y/o las LDL en sangre son al menos aproximadamente el 20% más bajos que antes de la administración del anticuerpo. Aún más preferentemente, el colesterol en sangre y/o las LDL en sangre son al menos el 30% más bajos que antes de la administración del anticuerpo. Ventajosamente, el colesterol en sangre y/o las LDL en sangre son al menos el 40% más bajos que antes de la administración del anticuerpo. Más ventajosamente, el colesterol en sangre y/o las LDL en sangre son al menos el 50% más bajos que antes de la administración del anticuerpo. Muy preferentemente, el colesterol en sangre y/o las LDL en sangre son al menos el 60% más bajos que antes de la administración del anticuerpo. Lo más

preferentemente, el colesterol en sangre y/o las LDL en sangre son al menos el 70% más bajos que antes de la administración del anticuerpo.

Con respecto a todos los procedimientos descritos en el presente documento, la referencia a anticuerpos dependientes de pH frente a cualquier
5 antígeno apropiado también incluye composiciones que comprenden uno o más agentes adicionales. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente excipientes adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones, que se conocen bien en la técnica. La presente invención se puede usar sola o en combinación con
10 otros procedimientos convencionales de tratamiento.

Los anticuerpos dependientes de pH se pueden administrar a un individuo por medio de cualquier vía adecuada. Debería ser patente para una persona experta en la técnica que los ejemplos descritos en el presente documento no pretenden ser limitantes pero pretenden ser ilustrativos de las
15 técnicas disponibles. De acuerdo con ello, en algunas realizaciones, el anticuerpo dependiente de pH se administra a un individuo de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, transdérmica,
20 subcutánea, intraarticular, sublingualmente, intrasinovial, por medio de insuflación, intratecal, oral, por inhalación o tópica. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, administración intravenosa, o localizada. Los nebulizadores comercialmente disponibles para formulaciones líquidas, incluyendo nebulizadores a chorro y nebulizadores ultrasónicos son útiles para
25 administración. Las formulaciones líquidas puede estar directamente

nebulizadas y el polvo liofilizado puede nebulizarse después de la reconstitución. Alternativamente, el anticuerpo dependiente de pH puede aerosolizarse usando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis medida, o puede inhalarse como un polvo liofilizado y molido.

- 5 En una realización, un anticuerpo dependiente de pH se administra por medio de técnicas de administración específica de sitio o por medio de administración local dirigida. Ejemplos de técnicas específicas de sitio o de técnicas dirigidas locales incluyen diversas fuentes de dispositivos implantables del anticuerpo dependiente de pH o del desarrollo local de catéteres, tales
- 10 como catéteres de infusión, catéteres permanentes, o catéteres de aguja, injertos sintéticos, envolturas adventicias, derivaciones y endoprótesis vasculares u otros dispositivos implantables, vehículos específicos de sitio, inyección directa, o aplicación directa. Véase, por ejemplo, documento PCT Publ. N.º: WO 00/53211 y la Patente de los EE.UU. N.º: 5,981,568.
- 15 Diversas formulaciones de un anticuerpo dependiente de pH se pueden usar para administración. En algunas realizaciones, el anticuerpo dependiente de pH puede administrarse puro. En algunas realizaciones, el anticuerpo dependiente de pH y un excipiente farmacéuticamente aceptable pueden estar en diversas formulaciones. Se conocen en la técnica excipientes
- 20 farmacéuticamente aceptables y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar como un diluyente. Excipientes adecuados incluyen pero no se limitan a agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar
- 25 osmolaridad, agentes encapsulantes, tampones, y potenciadores de

penetración cutánea. Los excipientes así como las formulaciones para administración de fármacos parenteral y no parenteral están expuestos en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20^a Edición, Mack Publishing (2000).

5 Estos agentes se pueden combinar con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y similares. El régimen particular de dosificación, es decir, dosis, ritmo y repetición, dependerá del individuo en particular y de la historia médica de ese individuo.

10 Los anticuerpos con unión dependiente de pH también se pueden administrar por medio de inhalación, como se describe en el presente documento. Generalmente, para administración de anticuerpos dependientes de pH anticuerpos, una dosificación candidata inicial puede ser de aproximadamente 2 mg/kg. Para el propósito de la presente invención, unas
15 dosificaciones diarias típicas podrían variar desde aproximadamente cualquiera de aproximadamente 3 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg, a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, se puede usar dosificación de aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 2,5 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg, de
20 aproximadamente 10 mg/kg y de aproximadamente 25 mg/kg. Para las administraciones repetidas durante varios días o más tiempo, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que tiene lugar una supresión de los síntomas o hasta que se logran suficientes niveles terapéuticos, por ejemplo, para reducir niveles de LDL en sangre. Un régimen de dosificación
25 ejemplar comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 2

mg/kg, seguida por una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo, o seguida por una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg cada dos semanas. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles, dependiendo del patrón de deterioro farmacocinético que el médico desee lograr. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se contempla la dosificación de una a cuatro veces a la semana. En otras realizaciones se contempla la dosificación una vez al mes o una vez cada dos meses o cada tres meses. Se hace un seguimiento del progreso de esta terapia fácilmente por técnicas convencionales y ensayos. El régimen de dosificación (incluyendo el anticuerpo usado) puede variar en función del tiempo.

Para el propósito de la presente invención, la dosificación adecuada de un anticuerpo dependiente de pH dependerá del anticuerpo (o composiciones de mismo) empleado, del tipo y gravedad de los síntomas a tratarse, de si el agente se administra para fines preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al agente, de los niveles de antígeno de la sangre del paciente, de la velocidad de síntesis y de la velocidad de eliminación para antígeno del paciente, de la velocidad de eliminación de los pacientes para el agente administrado, y de la discreción del médico que atiende. Típicamente al trabajador clínico se le administra un anticuerpo dependiente de pH hasta que se alcanza una dosis que logra el resultado deseado. La dosis y/o la frecuencia puede variar a lo largo del curso del tratamiento. Las consideraciones empíricas, tales como la semivida, generalmente contribuirán a la determinación de la dosificación. Por ejemplo, los anticuerpos que son compatibles con el sistema inmunitario humano, tales

- como anticuerpos humanizados o anticuerpos totalmente humanos, pueden usarse para prolongar la semivida del anticuerpo y para evitar el que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmune del huésped. La frecuencia de la administración pueden determinarse y ajustarse durante el curso de la
- 5 terapia, y está en general, pero no necesariamente, basada en tratamiento y/o supresión y/o mejora y/o retardo de síntomas, por ejemplo, hipercolesterolemia. Alternativamente, las formulaciones de liberación continua sostenida de anticuerpos pueden ser apropiadas. Se conocen en la técnica diversas formulaciones y dispositivos para lograr liberación sostenida.
- 10 En una realización, las dosificaciones para un anticuerpo antagonista pueden determinarse empíricamente en individuos a quienes se han dado una administración o más administraciones de un anticuerpo antagonista. Se están dando a los individuos dosificaciones incrementantes de un anticuerpo. Para evaluar la eficacia, se puede seguir un indicador de la enfermedad.
- 15 La administración de un anticuerpo dependiente de pH de acuerdo con el procedimiento en la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la afección fisiológica del receptor, de si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico, y de otros factores conocidos por los médicos expertos. La administración de un anticuerpo
- 20 dependiente de pH puede ser esencialmente continua durante un periodo de tiempo preseleccionado o puede estar en una serie de dosis espaciadas.
- En algunas realizaciones, más de un anticuerpo antagonista puede estar presente. Pueden estar presentes al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco diferentes, o más anticuerpos antagonistas y/o
- 25 péptidos. Generalmente, esos anticuerpos o péptidos pueden tienen

actividades complementarias que no se afectan adversamente unas a otras. Un anticuerpo dependiente de pH también se puede usar en conjunción con otros productos terapéuticos. Un anticuerpo dependiente de pH también se pueden usar junto con otros agentes que sirven para potenciar y/o
5 complementar la efectividad de los agentes.

Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales
10 como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metilparabeno o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales
15 como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA, azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos
20 metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteínas); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenoglicol (PEG).

Se preparan liposomas que contienen el anticuerpo dependiente de pH de anticuerpos por procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein, y col., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688; Hwang,
25 y col., 1980, Proc. Natl Acad. Sci. USA 77: 4030; y las Patentes de los EE.UU.

N.^{os}: 4,485,045 y 4,544,545. Los liposomas con tiempo de circulación potenciada se describen en la Patente de Estados Unidos N.^o 5,013,556. Los liposomas particularmente útiles se pueden generar por el procedimiento de evaporación en fase reversa con una composición lipídica que comprende
5 fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina PEG-derivatizada (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros de tamaño de poro definido para proporcionar liposomas con el diámetro deseado.

Los ingredientes activos pueden atraparse también en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización
10 interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington, The Science
15 and Practice of Pharmacy, 20^a Edición, Mack Publishing (2000).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas,
20 o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos N.^o 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico degradable-ácido glicólico tales
25 como LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de

copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), isobutirato de acetato de sacarosa y poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones a usarse para administración in vivo deben ser estériles. Esto puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones de anticuerpos dependientes de pH terapéuticas generalmente se introducen en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón que puede horadarse por una aguja de inyección hipodérmica.

Las emulsiones adecuadas pueden prepararse usando emulsiones grasas comercialmente disponibles, tales como Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ y Lipiphysan™. El ingrediente activo puede bien disolverse en una composición de emulsión pre-mezclada o bien alternativamente puede disolverse en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de alazor; aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz o aceite de almendra) y una emulsión formada después mezclando con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos de huevos, fosfolípidos de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que pueden añadirse otros ingredientes, por ejemplo glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas contendrán típicamente hasta aceite al 20%, por ejemplo, entre el 5 y el 20%. La emulsión grasa puede comprender gotitas de grasa entre 0,1 y 1,0 μm , particularmente 0,1 y 0,5 μm , y tiene un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0.

Las composiciones de emulsión pueden ser aquellas preparadas mezclando un anticuerpo dependiente de pH con Intralipid™ o con los

componentes del mismo (aceite de soja, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

Composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes farmacéuticamente aceptables, acuosos u orgánicos, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se expone anteriormente. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por la vía respiratoria oral o nasal para efecto local o sistémico. Se pueden nebulizar composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferentemente estériles por uso de gases. Las soluciones nebulizadas pueden respirarse directamente a partir del dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador puede estar unido a una máscara facial, a una tienda de nebulización o a una máquina de respiración de presión positiva intermitente. Se pueden administrar composiciones en solución, en suspensión o en polvo, preferentemente oralmente o nasalmente, a partir de dispositivos que administran la formulación en una manera apropiada.

B. Anticuerpos dependientes de pH

Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F (ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, mutantes de cadena sencilla (ScFv), de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de dominio), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento

de antígeno de la especificidad requerida, incluyendo variantes de glucosilación de anticuerpos, variantes de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados covalentemente. Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, de seres humanos, o de cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados).

En algunas realizaciones, el anticuerpo dependiente de pH es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo dependiente de pH también puede ser humanizado. En otras realizaciones, el anticuerpo es humano.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, es decir, que tiene una reducción de potencial para que provoque una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, la región constante se modifica tal como se describe en Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624; en la publicación PCT N.º WO99/58572; y/o en la solicitud de patente del Reino Unido N.º 9809951.8.

El Fc puede ser IgG₂ humana o ser IgG₄ humana. El Fc puede ser IgG₂ humana que contiene la mutación de A330P331 a S330S331 (IgG_{2Δa}), en la que los residuos aminoácidos están numerados con referencia a la secuencia de IgG2 de tipo salvaje. Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de IgG₄ que comprende las mutaciones siguientes (Armour y col., 2003, Molecular Immunology 40 585-593): de E233F234L235 a P233V234A235 (IgG_{4Δc}), en las que la numeración es con referencia a IgG4 de tipo salvaje. En otra realización más, el Fc es IgG₄ humana de E233F234L235 a P233V234A235 con delección de G236 (IgG_{4Δb}). En otra realización, el Fc es cualquier Fc de IgG₄ humana (IgG₄, IgG_{4Δb} o IgG_{4Δc}) que contenga la mutación de estabilización de bisagra

de S228 a P228 (Aalberse y col., 2002, Immunology 105, 9-19). En otra realización, el Fc puede ser Fc aglucosilado.

En algunas realizaciones, la región constante se aglucosila mutando el residuo de unión a oligosacárido (tal como Asn297) y/o flanqueando residuos que son parte de la secuencia de reconocimiento de glucosilación en la región constante. En algunas realizaciones, la región constante se aglucosila por glucosilación enlazada en N de manera enzimática. La región constante se puede aglucosilar por glucosilación enlazada en N de manera enzimática o mediante expresión en una célula huésped deficiente en glucosilación.

Una manera de determinar la afinidad de unión de anticuerpos a antígeno es midiendo la afinidad de unión de fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, se puede escindir un anticuerpo (por ejemplo, IgG) con papaína o expresar de manera recombinante. Se puede determinar la afinidad de un fragmento Fab de un anticuerpo mediante resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón superficial (SPR) Biacore3000™, Biacore, INC, Piscataway NJ), equipado con chips sensores de estreptavidina pre-inmovilizada (SA) usando el tampón de desplazamiento HBS-EP (HEPES 0,01M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005% v/v). El antígeno biotinilado se puede diluir en tampón HBS-EP hasta una concentración de menos de 0,5 µg/ml e inyectar a través de los canales de chip individuales usando tiempos de contacto variables, para lograr dos intervalos de densidad de antígeno, de 50-200 unidades de respuesta (RU) para estudios cinéticos detallados o bien de 800-1.000 RU para ensayos de rastreo. Estudios de regeneración han mostrado que NaOH 25 mM en etanol al 25% v/v retira de manera efectiva el Fab unido

mientras mantiene la actividad de antígeno en el chip durante 200 inyecciones. Normalmente, se inyectan diluciones en serie (concentraciones de extensión de K_D estimada de 0,1-10x) de muestras de Fab purificadas durante 1 min a 100µl/minuto y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 horas. Se

5 determinan las concentraciones de las proteínas de Fab mediante eletroforesis de SDS-PAGE y/o ELISA usando un Fab de concentración conocida (tal como se determina mediante análisis de aminoácidos) como patrón. Se obtienen velocidades de asociación (k_A) y velocidades de disociación (k_D) cinéticas simultáneamente ajustando los datos globalmente a un modelo de unión de

10 Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B., 1994. Methods Enzymology 6. 99-110) usando el programa de evaluación BIA. Los valores de la constante de disociación en el equilibrio (K_D) se calculan como k_D/k_A . Este protocolo es adecuado para su uso en la determinación de la afinidad de unión de un anticuerpo a cualquier antígeno, incluyendo el ser

15 humano u otras especies de mamíferos (tales como ratón, rata, primate). La afinidad de unión de un anticuerpo generalmente se mide a 25°C, pero también se puede medir a 37°C.

Los anticuerpos se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. La ruta y el programa de inmunización del animal

20 huésped en general son acordes con técnicas convencionales y establecidas para la estimulación y producción de anticuerpos, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. En la técnica se conocen técnicas generales para la producción de anticuerpos humanos y de ratón y/o se describen en el presente documento. Para anticuerpos dependientes de pH

25 contra PCSK9, un procedimiento actualmente preferido de preparación de los

anticuerpos comprende la inmunización de animales inactivados en PCSK9 (PCSK9 -/-) tal como se describe en el presente documento.

- Se contempla que cualquier sujeto mamífero incluyendo seres humanos o células productoras de anticuerpos de los mismos se puede manipular para
- 5 servir como base para la producción de líneas celulares de hibridoma de mamífero, incluyendo humano. Normalmente, el animal huésped se inocula intraperitonealmente, intramuscularmente, oralmente, subcutáneamente, intraplantar, y/o intradérmicamente con una cantidad de inmunógeno, incluyendo como se describe en el presente documento.
- 10 Se pueden preparar hibridomas a partir de los linfocitos y las células de mieloma inmortalizadas usando la técnica de hibridación de células somáticas general de Kohler, B. y Milstein, C., 1975, Nature 256:495-497 o la modificada por Buck, D. W., y cols., 1982, In Vitro, 18:377-381. En la hibridación se pueden usar líneas de mieloma disponibles, incluyendo, pero sin limitarse a X63-
- 15 Ag8.653 y las de Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., EE.UU. En general, la técnica implica fusionar las células de mieloma y células linfoides usando un fusógeno tal como polietilenoglicol, o mediante medios eléctricos bien conocidos por los expertos en la técnica. Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y se cultivan en un medio de
- 20 crecimiento selectivo, tal como un medio hipoxantina-aminoptericina-timidina (HAT), para retirar células parentales no hibridadas. Se puede usar cualquiera de los medios descritos en el presente documento, complementado con o sin suero, para cultivar los hibridomas que segregan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, se pueden usar linfocitos B
- 25 inmortalizados por el EBV para producir los anticuerpos monoclonales de

PCSK9 de la presente invención. Los hibridomas se expanden y se subclonan, si se desea, y los sobrenadantes se someten a ensayo para determinar su actividad anti-inmunógeno mediante procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático o
5 inmunoensayo de fluorescencia).

Los hibridomas que se pueden usar como una fuente de anticuerpos abarcan todos los derivados, células de la progenie de los hibridomas parentales que producen anticuerpos monoclonales específicos para PCSK9, o una porción de los mismos.

10 Se pueden cultivar los hibridomas que producen dichos anticuerpos in vitro o in vivo usando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar del medio de cultivo o de fluidos corporales, mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como precipitación con sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis,
15 cromatografía y ultrafiltración, si se desea. La actividad no deseada, si está presente, se puede retirar, por ejemplo, llevando a cabo la preparación sobre adsorbentes preparados a partir del inmunógeno unido a una fase sólida y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados del inmunógeno. La inmunización de un animal huésped con PCSK9 humano, o un fragmento que
20 contiene la secuencia de aminoácidos diana conjugado con una proteína que es inmunogénica en las especies que se van a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa de california, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente derivacional o bifuncional, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de
25 los residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de los residuos de

lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en la que R y R^1 son grupos alquilo diferentes, puede proporcionar una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

Una vez se generan o se seleccionan los anticuerpos, se pueden
5 optimizar los anticuerpos para una unión dependiente de pH, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 1, en el presente documento.

Si se desea, el anticuerpo dependiente de pH (monoclonal o policlonal) de interés se puede secuenciar y después se puede clonar la secuencia de polinucleótidos en un vector para expresión o propagación. Se puede mantener
10 la secuencia que codifica el anticuerpo de interés en un vector en una célula huésped y después se puede expandir la célula huésped y congelar para su uso futuro. Se puede llevar a cabo la producción de anticuerpos monoclonales recombinantes en cultivo celular a través de la clonación de genes de anticuerpo a partir de linfocitos B por medios conocidos en la técnica. Véase,
15 por ejemplo, Tiller y col., 2008, J. Immunol. Methods 329, 112; patente de los EE.UU. N.º 7.314.622.

En una alternativa, se puede usar la secuencia polinucleotídica para manipulación genética para “humanizar” el anticuerpo o para mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, se puede diseñar
20 la región constante para que se parezca más a las regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmunitaria si se usa el anticuerpo en ensayos clínicos y en tratamientos en seres humanos. Se puede desear la manipulación genética de la secuencia de anticuerpo para obtener una afinidad mayor a antígeno y una mayor eficacia. Será patente para un experto en la
25 técnica que se pueden hacer uno o más cambios de polinucleótidos al

anticuerpo dependiente de pH y mantener todavía su capacidad de unión de antígenos.

Hay cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Éstas son: (1) determinar el nucleótido y secuencia de aminoácidos predicha
5 de los dominios variables ligeros y pesados de anticuerpo de partida; (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región estructural de anticuerpo usar durante el procedimiento de humanización; (3) las técnicas/metodologías de humanización actuales; y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, las patentes de los
10 EE.UU. N.^{os} 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

Se ha descrito un número de moléculas de anticuerpo "humanizadas" que comprende un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos o que tienen regiones V de
15 roedores o de roedores modificadas y sus CDR asociadas condensadas a dominios constantes humanos. Véase, por ejemplo, Winter y cols., 1991, Nature 349:293-299; Lobuglio y cols., 1989, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224; Shaw y col., 1987, J Immunol. 138:4534-4538; y Brown y col., 1987, Cancer Res. 47:3577-3583. Otras referencias describen CDR de
20 roedores injertadas en una región estructural (FR) de soporte humana antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado. Véase, por ejemplo, Riechmann y cols., 1988, Nature 332:323-327; Verhoeyen y cols., 1988, Science 239:1534-1536; y Jones y col., 1986, Nature 321:522-525. Otra referencia describe CDR de roedores soportados por regiones estructurales de
25 roedores recombinantemente diseñadas. Véase, por ejemplo, la publicación de

patente europea N.º 0519596. Estas moléculas "humanizadas" se diseñan para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpo anti-humanas de roedores lo que limita la duración y eficacia de las aplicaciones terapéuticas de esos restos en receptores humanos. Por ejemplo,

5 se puede diseñar la región constante de anticuerpo de tal forma que sea inmunológicamente inerte (por ejemplo, no activa la lisis por complemento). Véanse, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO99/58572; la solicitud de patente del Reino Unido N.º 9809951.8. Otros procedimientos de humanizar anticuerpos que también se pueden utilizar se describen en Daugherty y col.,

10 1991, Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 y en las patentes de los EE.UU. N.ºs 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; y 6.350.861; y en la publicación PCT N.º WO 01/27160.

En otra alternativa más, se pueden obtener los anticuerpos totalmente humanos usando ratones comercialmente disponibles que se han diseñado

15 para expresar proteínas de inmunoglobulina humana específicas. También se pueden usar animales transgénicos que están diseñados para producir una respuesta inmunitaria más deseable o más fuerte para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Ejemplos de tal tecnología son Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA), HuMAb-Mouse® y TC Mouse™

20 de Medarex, Inc. (Princeton, NJ), y el ratón Veloclmmune ® de Regeneron Pharmaceuticals, Inc. (Tarrytown, NY).

En una alternativa, se pueden preparar de manera recombinante los anticuerpos y expresar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. En otra alternativa, se pueden preparar de manera recombinante los

25 anticuerpos mediante la tecnología de presentación en fagos. Véanse, por

ejemplo, las patentes de los EE.UU. N.^{os} 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; y 6.265.150; y Winter y cols., 1994, *Annu. Rev. Immunol.* 12:433- 455. Alternativamente, se puede usar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty y col., 1990, *Nature* 348:552-553) para producir anticuerpos

5 humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro, a partir repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulinas a partir de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan los genes del dominio V del anticuerpo en marco dentro de un gen de proteínas de la cubierta principal o secundaria de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como

10 fragmentos funcionales de anticuerpos sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades.

15 Así, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. Se puede realizar la presentación en fagos en una variedad de formatos; véase por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., 1993, *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571. Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fagos. Clackson y cols., 1991, *Nature*, 352:624-628

20 aislaron una colección diversa de anticuerpos contra oxazolona de una pequeña colección combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos contra una serie diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente

25 las técnicas descritas por Marks y col., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, o

Griffith y col., 1993, EMBO J. 12:725-734. En una respuesta inmunitaria natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones en una tasa alta (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán afinidad más alta, y los linfocitos B que presentan inmunoglobulina de superficie de afinidad alta se

5 replican y se diferencian preferentemente durante la exposición a antígeno posterior. Este procedimiento natural se puede imitar empleando la técnica conocida como "mezclado de cadenas". (Marks y col., 1992, Bio/Technol. 10:779-783). En este procedimiento, la afinidad de los anticuerpos humanos "primarios" obtenidos mediante la presentación en fagos se puede mejorar

10 reemplazando secuencialmente los genes de región V de cadena ligera y pesada con repertorios de variantes que se producen de manera natural (repertorios) de genes de dominio V obtenidos a partir de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo pM-nM. Una estrategia para

15 preparar repertorios de anticuerpos de fagos muy grandes (también conocidos como "la madre de todas las colecciones") se ha descrito por Waterhouse y col., 1993, Nucl. Acids Res. 21:2265-2266. También se puede usar el mezclado de genes para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos de roedores, en los que el anticuerpo humano tiene especificidades y afinidades similares al

20 anticuerpo de roedor de partida. De acuerdo con este procedimiento, que también se denomina como "impronta de epítipo", el gen de dominio V de cadena pesada o ligera de anticuerpos de roedores obtenido mediante la técnica de presentación en fagos es reemplazado por un repertorio de genes del dominio V humanos, creando quimeras humano-roedor. La selección de

25 antígenos da como resultado el aislamiento de regiones humanas variables que

pueden restaurar un sitio de unión a antígeno funcional, es decir, el epítipo gobierna (impronta) la elección del compañero. Cuando el procedimiento se repite para reemplazar el dominio V de roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase publicación PCT N.º WO 93/06213). A diferencia de
5 la humanización tradicional de anticuerpos de roedores mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de CDR o estructurales de origen de roedor.

Es patente que aunque la discusión anterior se aplica a anticuerpos humanizados, los principios generales discutidos se aplican a anticuerpos de
10 personalización para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Además es evidente que se pueden combinar uno o más aspectos de la humanización de un anticuerpo descrito en el presente documento, por ejemplo, injerto de CDR, mutación estructural y mutación de CDR.

Los anticuerpos se pueden preparar de manera recombinante aislando
15 en primer lugar los anticuerpos y las células productoras de anticuerpo a partir de animales huésped, obteniendo la secuencia génica, y usando la secuencia génica para expresar de manera recombinante el anticuerpo en células huésped (por ejemplo, células CHO). Otro procedimiento que se puede emplear es el de expresar la secuencia de anticuerpo en plantas (por ejemplo,
20 tabaco) o en leche transgénica. Se han dado a conocer procedimientos para expresar anticuerpos de manera recombinante en plantas o en leche. Véase, por ejemplo, Peeters, 2001, y col. Vaccine 19:2756; Lonberg, N. y D. Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol 13:65; y Pollock, y col., 1999, J Immunol Methods 231:147. Los procedimientos para preparar derivados de anticuerpos, por
25 ejemplo, humanizados, de cadena simple, etc, son conocidos en la técnica.

También se pueden emplear los inmunoensayos y las técnicas de clasificación de citometría de flujo tales como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para aislar anticuerpos que son específicos para el antígeno deseado.

5 Los anticuerpos pueden estar unidos a muchos vehículos. Los vehículos pueden ser activos y/o inertes. Ejemplos vehículos bien conocidos incluyen polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, vidrio, celulosas modificadas y naturales, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o bien insoluble para los propósitos
10 de la invención. Los expertos en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para unir a anticuerpos, o podrán determinar tales, usando experimentación de rutina. En algunas realizaciones, el vehículo comprende un resto que dirige el miocardio.

 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y
15 se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de ese ADN. Una vez aislado, el ADN se puede introducir en vectores de expresión (tales como los
20 vectores de expresión dados a conocer en la publicación PCT N.º WO 87/04462), que después se transfectan dentro de células huésped tales como células de E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster Chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las
25 células huésped recombinantes. Véase, por ejemplo, la publicación PCT N.º

WO 87/04462. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena ligera y pesada humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas, Morrison y col., 1984, Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, o uniendo covalentemente a la
5 secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido distinto de inmunoglobulina. De esa manera, los anticuerpos “quiméricos” o “híbridos” se preparan para que tengan la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal en el presente documento.

Los polipéptidos y anticuerpos dependientes de pH derivados de los
10 anticuerpos se pueden identificar o caracterizar usando procedimientos conocidos en la técnica, de modo que se detecta y/o se mide la reducción, mejora o neutralización de la actividad biológica. En algunas realizaciones, se identifica un polipéptido o anticuerpo dependiente de pH incubando un agente candidato con antígeno y uniendo con monitorización y/o reducción auxiliar o
15 neutralización de una actividad biológica. Se puede llevar a cabo el ensayo de unión con polipéptido(s) de antígeno purificado o con células que expresan de manera natural, o transfectar para expresar, el polipéptido(s). En una realización, el ensayo de unión es un ensayo de unión competitivo, en el que se evalúa la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un
20 antagonista conocido para determinar la unión. Se puede llevar a cabo el ensayo en diversos formatos, incluyendo el formato de ELISA. En otras realizaciones, se identifica un anticuerpo dependiente de pH incubando un agente candidato con el antígeno y uniendo con monitorización y con la inhibición auxiliar de la expresión de LDLR y/o la eliminación de colesterol de la
25 sangre.

Después de la identificación inicial, se puede confirmar adicionalmente la actividad de un anticuerpo dependiente de pH candidato y refinar mediante bioensayos que se sabe que prueban las actividades biológicas marcadas. Alternativamente, se pueden usar bioensayos para la detección selectiva de
5 candidatos directamente. Algunos de los procedimientos para identificar y caracterizar anticuerpos, péptidos o aptámeros se describen en detalle en los ejemplos.

Se pueden caracterizar los anticuerpos con unión dependiente de pH usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un
10 procedimiento es el de identificar el epítipo al que se une, o “mapeo de epítipos.” Hay muchos procedimientos conocidos en la técnica para el mapeo y la caracterización de la localización de epítipos sobre proteínas, incluyendo resolver la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmento de gen y ensayos basados
15 en péptido sintético, tal como se describe, por ejemplo, en el capítulo 11 de Harlow y Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999). En un ejemplo adicional, se puede usar el mapeo de epítipos para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo dependiente de pH. El mapeo de epítipos está
20 comercialmente disponible a partir de varias fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Holanda). El epítipo puede ser un epítipo lineal, es decir, contenido en un único tramo de aminoácidos, o un epítipo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que no tienen que estar necesariamente contenidos en un único
25 tramo. Se pueden aislar péptidos de diversas longitudes (por ejemplo, al menos

de 4-6 aminoácidos de longitud) o sintetizar (por ejemplo, de manera recombinante) y usar para ensayos de unión con un anticuerpo. En otro ejemplo, el epítipo al que se une el anticuerpo dependiente de pH se puede determinar de un rastreo sistemático usando péptidos solapantes derivados de

5 la secuencia de antígeno y determinando la unión por el anticuerpo. De acuerdo con el ensayo de expresión de fragmento de gen, la fase de lectura abierta que codifica el antígeno se fragmenta aleatoriamente o bien mediante construcciones genéticas específicas y se determina la reactividad de los fragmentos de antígeno expresados con el anticuerpo que se van a analizar.

10 Los fragmentos de gen se pueden producir, por ejemplo, mediante PCR y después transcribir y traducir en proteína in vitro, en presencia de radiactivos aminoácidos. Después se determina la unión del anticuerpo a los fragmentos marcados radiactivamente mediante electroforesis en gel e inmunoprecipitación. También se pueden identificar ciertos epítipos usando

15 grandes colecciones de secuencias peptídicas aleatorias presentadas en la superficie de partículas de fagos (colecciones de fagos). De manera alternativa, se puede someter a prueba una colección de fragmentos peptídicos solapantes para analizarse la unión al anticuerpo de prueba en ensayos de unión simple. En un ejemplo adicional, se puede realizar la mutagénesis de un dominio de

20 unión a antígenos, experimentos de intercambio de dominio y mutagénesis mediante alanina para identificar residuos requeridos, suficientes y/o necesarios para la unión de epítipos. Por ejemplo, se pueden realizar experimentos de intercambio de dominio usando un antígeno mutante en el que se han reemplazado (intercambiado) diversos fragmentos del polipéptido con

25 secuencias de antígeno de otra especie, o una proteína estrechamente

relacionada pero antigénicamente distinta (tal como otro miembro de la familia proproteína convertasa). Evaluando la unión del anticuerpo al antígeno mutante, se puede evaluar la importancia del fragmento de antígeno particular a la unión de anticuerpo.

5 Otro procedimiento más que se puede usar para caracterizar un anticuerpo dependiente de pH es usar ensayos de competición con otros anticuerpos conocidos por unirse al mismo antígeno para determinar si el anticuerpo dependiente de pH se une al mismo epítipo como otros anticuerpos. Los ensayos de competición se conocen bien por los expertos en
10 la técnica.

Se puede usar un vector de expresión para dirigir la expresión de un anticuerpo dependiente de pH. Un experto en la técnica está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena in vivo. Véase, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. N.^{os}
15 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471. La administración de vectores de expresión incluye administración sistémica o local, incluyendo inyección, administración oral, administración cateterizada o por pistola genética y administración tópica. En otra realización, el vector de expresión se administra directamente al ganglio o tronco simpático, o en una arteria coronaria, atrio, ventrículo o
20 pericardio.

También se puede usar liberación dirigida de composiciones terapéuticas que contienen un vector de expresión o polinucleótidos subgenómicos. Las técnicas de liberación de ADN mediada por receptores se describen, por ejemplo, en Findeis y col., 1993, Trends Biotechnol. 11:202;
25 Chiou y cols., 1994, Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct

Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.); Wu y cols., 1988, J. Biol. Chem. 263:621; Wu y cols., 1994, J. Biol. Chem. 269:542; Zenke y col., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3655; Wu et al., 1991, J. Biol. Chem. 266:338. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido se administran en un intervalo de

5 aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para administración local en un protocolo de terapia génica. Intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg, y de aproximadamente 20 µg a aproximadamente

10 100 µg de ADN también se pueden usar durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos se pueden liberar usando vehículos de liberación génica. El vehículo de liberación génica puede ser de origen vírico o no vírico (véase en general, Jolly, 1994, Cancer Gene Therapy 1:51; Kimura, 1994, Human Gene Therapy 5:845; Connelly, 1995,

15 Human Gene Therapy 1:185; y Kaplitt, 1994, Nature Genetics 6:148). Se puede inducir la expresión de tales secuencias codificantes usando promotores heterólogos o mamíferos endógenos. La expresión de la secuencia codificante pueden ser constitutiva o bien regulada.

Los vectores basados en virus para la administración de un

20 polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada se conocen bien en la técnica. Ejemplos de vehículos basados en virus incluyen, pero no se limitan a, retrovirus recombinantes (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N.^{os} WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; las patentes de los EE.UU. N.^{os} 5.219.740 y

25 4.777.127; la patente de GB N.^o 2.200.651; y la patente de EP N.^o 0 345 242),

vectores basados en alfavirus (por ejemplo, vectores víricos Sindbis, virus del bosque de Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus Ross River (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), y virus adeno-
5 asociados (AAV) vectores (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N.^{os} WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). La administración de ADN enlazado a adenovirus muerto tal como se describe en Curiel, 1992, Hum. Gene Ther. 3:147, también se puede emplear.

10 También se pueden emplear procedimientos y vehículos de liberación no víricos, incluyendo, pero sin limitarse a, ADN condensado policationico enlazado o no enlazado a adenovirus muerto solo (véase, por ejemplo, Curiel, 1992, Hum. Gene Ther. 3:147); ADN enlazado a ligando (véase, por ejemplo, Wu, J., 1989, Biol. Chem. 264:16985); células de vehículos de liberación de
15 celulares eucariotas (véanse, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 5.814.482; las publicaciones PCT N.^{os} WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y fusión o neutralización de carga de nucleico con las membranas celulares. También se puede emplear ADN desnudo. Procedimientos de introducción de ADN desnudo ejemplares se describen en la
20 publicación PCT N.º WO 90/11092 y en la patente de los EE.UU. N.º 5.580.859. Los liposomas que pueden actuar como vehículos de liberación de genes se describen en la patente de los EE.UU. N.º 5.422.120; las publicaciones PCT N.^{os} WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y el documento EP 0524968. Estrategias adicionales se describen en Philip, 1994, Mol. Cell Biol., 14:2411, y
25 en Woffendin, (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:1581.

Esta invención comprende composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden anticuerpos descritos en el presente documento o preparados mediante los procedimientos y que tienen las características descritas en el presente documento. Tal como se usa en el

5 presente documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos dependientes de pH y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más de estos anticuerpos. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente excipientes adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones,

10 que se conocen bien en la técnica.

La invención también proporciona partes de CDR de anticuerpos dependientes de pH (incluyendo CDR de Chotia y de Kabat). La determinación de regiones CDR está dentro del alcance de la técnica. Se entiende que en algunas realizaciones, las CDR pueden ser una combinación de las CDR de

15 Kabat y Chotia (también denominadas "CDR combinadas" o "CDR extendidas"). En algunas realizaciones, las CDR son las CDR de Kabat. En otras realizaciones, las CDR son los CDR de Chothia. En otras palabras, en realizaciones con más de una CDR, las CDR pueden ser cualquiera de Kabat, Chothia, CDR de combinación, o combinaciones de las mismas.

20 La invención también proporciona procedimientos de preparar cualquiera de estos anticuerpos o polipéptidos. Los anticuerpos de esta invención se pueden preparar mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos se pueden producir mediante degradación proteolítica u otra degradación de los anticuerpos, mediante procedimientos recombinantes (es

25 decir, polipéptidos de fusión o simples) tal como se describe anteriormente o

mediante síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente los polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se elaborada convenientemente mediante síntesis química. Los procedimientos de síntesis química se conocen en la técnica y están comercialmente disponibles.

- 5 Por ejemplo, se podría producir un anticuerpo mediante un sintetizador de polipéptidos automatizado empleando el procedimiento de fase sólida. Véanse también, las patentes de los EE.UU. N.^{os} 5.807.715; 4.816.567 y 6.331.415.

- En otra alternativa, los anticuerpos y péptidos se pueden preparar de manera recombinante usando procedimientos que se conocen bien en la
10 técnica. En una realización, un polinucleótido comprende una secuencia que codifica las regiones variables de cadena pesada y/o de cadena ligera de anticuerpo 4A5, 5A10, 6F6, 7D4 o L1L3. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés se puede mantener en un vector en una célula huésped y después la célula huésped se puede expandir y congelar para uso futuro. Los
15 vectores (incluyendo vectores de expresión) y las células huésped se describen adicionalmente en el presente documento.

- La invención también comprende scFv de anticuerpos de esta invención. Los fragmentos de región variable de cadena individual se preparan enlazando las regiones variables de cadena pesada y/o ligera usando un péptido de
20 enlace corto. Bird y cols., 1988, Science 242:423-426. Un ejemplo de un péptido de enlace es (GGGGS)₃(SEC ID N.º:22), que puentea aproximadamente 3,5 nm entre el extremo carboxi de una región variable y el extremo amino de la otra región variable. Se han diseñado y usado enlazadores de otras secuencias. Bird et al., 1988, supra. Los enlazadores
25 deben ser polipéptidos flexibles, cortos y preferiblemente constituidos por

menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos. A su vez, los enlazadores se pueden modificar para funciones adicionales, tales como unión de fármacos o unión a soportes sólidos. Las variantes de cadena individual se pueden producir bien recombinante o sintéticamente. Para la producción

5 sintética de scFv, se puede usar un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, se puede introducir un plásmido adecuado que contiene polinucleótido que codifica el scFv dentro de una célula huésped adecuada, bien eucariota, tal como células de levadura, planta, insecto o mamífero o procariota, tal como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican el

10 scFv de interés se pueden preparar mediante manipulaciones rutinarias tales como la ligación de polinucleótidos. El scFv resultante se puede aislar usando técnicas de purificación proteica estándar conocidas en la técnica.

También están comprendidas otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos

15 biespecíficos, bivalentes en los que los dominios VH y VL se expresan sobre una única cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión de antígeno

20 (véase por ejemplo, Holliger, P., et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, y Poljak y cols., 1994, *Structure* 2:1121-1123).

Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes, usando los anticuerpos descritos en el presente

25 documento. Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos son

conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Suresh y col., 1986, *Methods in Enzymology* 121:210). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basaba en la coexpresión de dos pares de cadenas ligeras - cadenas pesadas de inmunoglobulina, teniendo las dos
5 cadenas pesadas diferentes especificidades (Millstein y Cuello, 1983, *Nature* 305, 537-539).

De acuerdo con una estrategia en la preparación de anticuerpos biespecíficos, se fusionan los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno)
10 a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferiblemente, la fusión es con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones CH2 y CH3 bisagra. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente al menos en una de
15 las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan dentro de un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en las
20 realizaciones cuando las razones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. No obstante, es posible insertar las secuencias codificantes por dos o por las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en razones iguales da como resultado rendimientos
25 altos o cuando las razones no son de particular importancia.

- En una estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada - cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión)
- 5 en el otro brazo. Esta estructura asimétrica, con una cadena ligera de inmunoglobulina sólo en una mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas. Esta estrategia se describe en la publicación PCT N.º WO 94/04690.
- 10 Los anticuerpos heteroconjugados, que comprenden dos anticuerpos unidos covalentemente, también están dentro del alcance de la invención. Tales anticuerpos se han usado para marcar para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (patentes de los EE.UU. N.ºs 4.676.980) y para el tratamiento de infección por VIH (publicaciones PCT N.ºs WO 91/00360
- 15 y WO 92/200373; documento EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Las técnicas y los agentes de reticulación adecuados se conocen bien en la técnica y se describen en la patente de los EE.UU. N.º 4.676.980.
- Los anticuerpos quiméricos o híbridos también se pueden preparar in
- 20 vitro usando procedimientos conocidos de química de proteínas de síntesis, incluyendo las que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.
- 25 Se puede preparar el anticuerpo humanizado que comprende una

o más CDR de anticuerpos 5A10 o 7D4 o una o más CDR derivadas de anticuerpos 5A10 o 7D4, por ejemplo, usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Éstas son: (1) determinar el
5 nucleótido y secuencia de aminoácidos predicha de los dominios variables ligeros y pesados de anticuerpo de partida; (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región estructural de anticuerpo usar durante el procedimiento de humanización; (3) usar las técnicas/metodologías de humanización actuales; y (4) transfectar y expresar el anticuerpo humanizado.
10 Véanse, por ejemplo, las patentes de los EE.UU N.^{os} 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

En los anticuerpos humanizados recombinantes, la parte Fc se puede modificar para evitar la interacción con el receptor de Fcγ y el complemento y
15 los sistemas inmunitarios. Las técnicas para la preparación de tales anticuerpos se describen en el documento WO 99/58572. Por ejemplo, la región constante se puede diseñar para parecerse más a las regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmunitaria si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Véase, por ejemplo, las patentes de los EE.UU
20 N.^{os} 5.997.867 y 5.866.692.

El anticuerpo humanizado que comprende las regiones variables de cadena ligera o pesada o una o más CDR de un anticuerpo o sus variantes, o una o más CDR derivadas del anticuerpo o sus variantes, se puede preparar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica.

25 Los anticuerpos humanizados se pueden preparar mediante cualquier

procedimiento conocido en la técnica.

La invención abarca modificaciones a los anticuerpos y polipéptidos de la invención, incluyendo anticuerpos funcionalmente equivalentes, lo que no afecta de manera significativa a sus propiedades y variantes que tienen
5 afinidad y/o actividad potenciada o disminuida. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos se puede mutar para obtener un anticuerpo con la afinidad de unión deseada a su antígeno. La modificación de polipéptidos es una práctica rutinaria en la técnica y no es necesario describirla en detalle en el presente documento. La modificación de polipéptidos se ejemplifica en los ejemplos. Los
10 ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente de manera perjudicial la actividad funcional, o que madura (potencia) la afinidad del polipéptido por su ligando, o uso de análogos químicos.

15 Las inserciones de las secuencias de aminoácidos incluyen fusiones en los extremos amino y/o carboxilo que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos aminoacídicos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo en el
20 extremo N o el anticuerpo fusionado a una marca de epítipo. Otras variantes de inserciones de una molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima o a un polipéptido que aumenta la semivida del anticuerpo en la circulación sanguínea.

Las variantes de sustitución tienen al menos un residuo de aminoácido
25 en la molécula de anticuerpo retirado y un residuo diferente insertado en su

lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones de las FR. En la tabla 1 se muestran sustituciones conservativas bajo el encabezamiento de “sustituciones conservativas”. Si tales sustituciones provocan un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados “sustituciones ejemplares”, o como se describe más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y cribar los productos.

10

Tabla 1: Sustituciones aminoacídicas

Residuo original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones ejemplares
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe

Residuo original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones ejemplares
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

Se logran modificaciones sustanciales de las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren de forma significativa en su efecto para mantener (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, en forma de una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o capacidad hidrófoba de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que se producen de manera natural se dividen en grupos basados en propiedades comunes de las cadenas laterales: (1) No polares: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) Polar sin carga: Cys, Ser, Thr Asn, Gln; (3) Ácidos (cargados negativamente): Asp, Glu; (4) Básicos (cargados positivamente): Lys, Arg; (5) Residuos que influyen en la orientación de las cadenas: Gly, Pro; y (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe, His.

Las sustituciones no conservadoras se preparan intercambiando un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no implicado en mantener la conformación apropiada del anticuerpo también puede ser sustituido, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir reticulaciones aberrantes. A la inversa, se pueden añadir enlace(s) de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad, en particular cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv.

Las modificaciones de aminoácidos pueden variar desde el cambio o la modificación de uno o más aminoácidos hasta el rediseño completo de una

región, tal como la región variable. Los cambios en la región variable pueden alterar la especificidad y/o afinidad de unión. En algunas realizaciones, no se hacen más de uno a cinco sustituciones de aminoácidos conservadoras dentro un dominio de CDR. En otras realizaciones, no se hacen más de una a tres
5 sustituciones de aminoácidos conservadoras dentro un dominio de CDR. Aún en otras realizaciones, el dominio de CDR es CDR H3 y/o CDR L3.

Las modificaciones también incluyen polipéptidos glucosilados y no glucosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones postraduccionales, tales como, por ejemplo, glucosilación con diferentes
10 azúcares, acetilación y fosforilación. Los anticuerpos están glucosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128; Wright y Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de las proteínas (Boyd y col., 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318;
15 Wittwe y Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180) y a la interacción intramolecular entre partes de la glucoproteína, que puede afectar a la conformación y la superficie tridimensional presentada de la glucoproteína (Jefferis y Lund, referencia anterior; Wyss y Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir una
20 glucoproteína a ciertas moléculas basándose en estructuras de reconocimiento específicas. También se ha comunicado que la glucosilación de los anticuerpos afectar al CCDA. En particular, se comunicó que las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una formación de catalización de glucosiltransferasa de GlcNAc
25 separada, tienen una actividad de CCDA mejor (Umana y cols., 1999, Nature

Biotech. 17:176-180).

Normalmente, la glucosilación de los anticuerpos está enlazada a N o enlazada a O. Enlazada a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparragina. Las secuencias tripeptídicas
5 asparragina-X-serina, asparragina-X-treonina y asparragina-X-cisteína, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparragina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La
10 glucosilación enlazada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se logra
15 convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para los sitios de glucosilación enlazados a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glucosilación
20 enlazados a O).

También se puede alterar el patrón de glucosilación de los anticuerpos sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glucosilación depende considerablemente de la célula huésped usada para expresar el anticuerpo. Dado que el tipo celular usado para la expresión de glucoproteínas
25 recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, como terapia potencial raramente es

la célula nativa, se pueden esperar variaciones en el patrón de glucosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Hse y cols., 1997, J. Biol. Chem. 272:9062-9070).

Además de la elección de las células huésped, los factores que afectan a la glucosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, la formulación del medio, la densidad de cultivo, la oxigenación, el pH, esquemas de purificación y similares. Se han propuesto diversos procedimientos para modificar el patrón de glucosilación logrado en un organismo huésped particular incluyendo introducir o sobreexpresar ciertas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (patentes de los EE.UU. N.^{os} 5.047.335, 5.510.261 y 5.278,299. Se puede eliminar enzimáticamente la glucosilación, o ciertos tipos de glucosilación, de la glucoproteína, por ejemplo, usando endoglucosidasa H (Endo H), N-glucosidasa F, endoglucosidasa F1, endoglucosidasa F2, endoglucosidasa F3. Además, la célula huésped recombinante se pueden modificar genéticamente para ser defectiva en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas técnicas y otras similares se conocen bien en la técnica.

Otros procedimientos de modificación incluyen usar técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Las modificaciones se pueden usar, por ejemplo, para unir etiquetas para inmunoensayo. Los polipéptidos se preparan usando procedimientos establecidos en la técnica y se pueden analizar usando ensayos estándar conocidos en la técnica, de los que algunos se describen más adelante y en los ejemplos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo comprende una

región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte o parcialmente inerte, por ejemplo, no activa la lisis mediada por complemento, no estimula CCDA, o no activa microglia; o tienen actividades reducidas (en comparación con el anticuerpo no modificado) en una

5 cualquiera o más de los siguientes: activar la lisis mediada por complemento, estimular CCDA o activar microglia. Se pueden usar diferentes modificaciones de la región constante para lograr un nivel óptimo y/o una combinación de las funciones efectoras. Véase, por ejemplo, Morgan et al., 1995, Immunology 86:319-324; Lund y cols., 1996, J. Immunology 157:4963-9 157:4963-4969;

10 Idusogie y cols., 2000, J. Immunology 164:4178-4184; Tao y col., 1989, J. Immunology 143: 2595-2601; y Jefferis y cols., 1998, Immunological Reviews 163:59-76. En algunas realizaciones, la región constante se modifica tal como se describe en Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624; en la publicación PCT N.º WO99/58572; y/o en la solicitud de patente de Reino Unido N.º 9809951.8.

15 En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de IgG2 de cadena pesada humana que comprende las siguientes mutaciones: de A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2 de tipo salvaje). Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624. Aún en otras realizaciones, la región constante es aglucosilada para glucosilación

20 enlazada a N. En algunas realizaciones, la región constante es aglucosilada para glucosilación enlazada a N mutando el residuo aminoacídico glucosilado o los residuos flanqueantes que son parte de la secuencia de reconocimiento de N-glucosilación en la región constante. Por ejemplo, el sitio de N-glucosilación N297 se puede mutar a A, Q, K o H. Véase, Tao y col., 1989, J. Immunology

25 143: 2595-2601; y Jefferis y cols., 1998, Inmunológicos Reviews 163:59-76. En

algunas realizaciones, la región constante es aglucosilada para glucosilación
enlazada a N. La región constante se puede aglucosilar por glucosilación
enlazada a N de manera enzimática (tal como retirar el carbohidrato mediante
la enzima Pngasa), o mediante expresión en una célula huésped deficiente en
5 glucosilación.

Otras modificaciones de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han
modificado tal como se describe en la publicación PCT N.º WO 99/58572. Estos
anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la
molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos
10 sustancialmente homóloga a todo o parte de un dominio constante de una
cadena pesada de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos pueden unir la
molécula diana sin activar la lisis dependiente de complemento significativa, o
la destrucción mediada por células de la diana. En algunas realizaciones, el
dominio efector puede unir específicamente FcRn y/o FcγRIIb. Éstos
15 normalmente se basan en dominios quiméricos derivados de dos o más
dominios de cadena pesada C_H2 de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos
modificados de este modo son particularmente adecuados para su uso en
terapia de anticuerpo crónica, para evitar reacciones inflamatorias y otras
reacciones adversas a la terapia de anticuerpo convencional.

20 La invención incluye con realizaciones de afinidad madurada. Por
ejemplo, los anticuerpos con afinidad madurada se pueden producir mediante
procedimientos conocidos en la técnica (Marks y col., 1992, Bio/Technology,
10:779-783; Barbas y col., 1994, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813;
Schier y col., 1995, Gene, 169:147-155; Yelton y col., 1995, J. Immunol.,
25 155:1994-2004; Jackson y col., 1995, J. Immunol., 154(7):3310-9; Hawkins y

col., 1992, J. Mol. Biol., 226:889-896; y publicación PCT N.º WO2004/058184).

Se pueden usar los siguientes procedimientos para el ajuste de la afinidad de un anticuerpo y para caracterizar una CDR. Una forma de caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o de alterar (tal como mejorar) la

5 afinidad de unión de un polipéptido, tal como un anticuerpo se denomina "mutagénesis mediante colecciones". En general, la mutagénesis mediante colecciones funciona como sigue. Una o más posiciones de aminoácidos en la CDR se reemplazan con dos o más (tales como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) aminoácidos usando procedimientos

10 reconocidos en la técnica. Esto genera colecciones pequeñas de clones (en algunas realizaciones, una para cada posición aminoacídica que se analiza), cada una con una complejidad de dos o más miembros (si dos o más aminoácidos están sustituidos en cada posición). En general, la colección también incluye un clon que comprende el aminoácido nativo (no sustituido). Se

15 rastrea un número pequeño de clones, por ejemplo, aproximadamente 20-80 clones (dependiendo de la complejidad de la colección), de cada colección para determinar su afinidad de unión al polipéptido diana (u otra diana de unión), y se identifican los candidatos con un incremento, la misma, una disminución o ninguna unión. Los procedimientos para determinar la afinidad de unión se

20 conocen bien en la técnica. Se puede determinar la afinidad de unión usando el análisis de resonancia en plasmón superficial Biacore, que detecta diferencias en la afinidad de unión de aproximadamente 2 veces o mayor. Biacore es particularmente útil cuando el anticuerpo de partida ya se une con una afinidad relativamente alta, por ejemplo una K_D de aproximadamente 10 nM o menos.

25 El rastreo usando resonancia de plasmón superficial Biacore se describe en los

ejemplos, en el presente documento.

Se puede determinar la afinidad de unión usando Kinexa Biocensor, ensayos de proximidad de centelleo, ELISA, inmunoensayo de ORIGEN (IGEN), desactivación de fluorescencia, transferencia de fluorescencia y/o presentación de levaduras. También se puede rastrear la afinidad de unión usando un bioensayo adecuado.

En algunas realizaciones, cada posición aminoacídica en un CDR es reemplazada (en algunas realizaciones, una de cada vez) con todos los 20 aminoácidos naturales usando procedimientos de mutagénesis reconocidos por la técnica (de los que algunos se describen en el presente documento). Esto genera colecciones pequeñas de clones (en algunas realizaciones, una para cada posición aminoacídica que se analiza), cada uno con una complejidad de 20 miembros (si todos los 20 aminoácidos están sustituidos en cualquier posición).

En algunas realizaciones, la colección que se va a rastrear comprende sustituciones en dos o más posiciones, que pueden estar en la misma CDR o en dos o más CDR. Así, la colección puede comprender sustituciones en dos o más posiciones en una CDR. La colección puede comprender sustitución en dos o más posiciones en dos o más CDR. La colección puede comprender sustitución en 3, 4, 5 ó más posiciones, tales posiciones encontradas en dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR. Se puede preparar la sustitución usando codones de redundancia baja. Véase, por ejemplo, la tabla 2 de Balint y cols., 1993, Gene 137 (1): 109-18).

La CDR puede ser CDRH3 y/o CDRL3. La CDR puede ser una o más de CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, y/o CDRH3. La CDR puede ser una

CDR de Kabat, una CDR de Chothia o una CDR extendida.

Se pueden secuenciar candidatos con una unión mejorada, identificando así un mutante de sustitución de CDR que da como resultado una afinidad mejorada (también denominada una sustitución "mejorada"). También se
5 pueden secuenciar los candidatos que se unen, identificando así una sustitución de CDR que retiene la unión.

Se pueden llevar a cabo múltiples rondas de rastreo. Por ejemplo, los candidatos (comprendiendo cada uno una sustitución de aminoácido en una o más posiciones de una o más CDR) con unión mejorada también son útiles
10 para el diseño de una segunda colección que contiene al menos el aminoácido original y sustituido en cada posición de CDR mejorada (es decir, la posición aminoacídica en la CDR en la que un mutante de sustitución mostró unión mejorada). La preparación, el rastreo, y la selección de esta colección se discute a continuación.

15 La mutagénesis mediante colección también proporciona un medio para caracterizar una CDR, en la medida en que la frecuencia de los clones con unión mejorada, la misma unión, unión disminuida o ninguna unión también proporciona información relativa a la importancia de cada posición aminoacídica para la estabilidad del complejo anticuerpo-antígeno. Por
20 ejemplo, si una posición de la CDR retiene la unión cuando se cambia a todos los 20 aminoácidos, esa posición se identifica como una posición que es improbable que se requiera para la unión al antígeno. En cambio, si una posición de CDR retiene la unión sólo en un porcentaje pequeño de sustituciones esa posición se identifica como una posición que es importante
25 para la función CDR. Así, los procedimientos de mutagénesis mediante

colecciones generan información relacionada con las posiciones en las CDR que se pueden cambiar a muchos aminoácidos distintos (incluyendo todos los 20 aminoácidos), y posiciones en las CDR que no se pueden cambiar o que sólo se pueden puede cambiar a unos pocos aminoácidos.

- 5 Los candidatos con afinidad mejorada se pueden combinar en una segunda colección, que incluye el aminoácido mejorado, el aminoácido original y pueden incluir adicionalmente sustituciones adicionales en esa posición, dependiendo de la complejidad de la colección que se desee, o se permite usando el rastreo deseado o el procedimiento de selección. Además, si se
10 desea, y se puede aleatorizar una posición aminoacídica adyacente a al menos dos o más aminoácidos. La aleatorización de aminoácidos adyacentes puede permitir flexibilidad conformacional adicional en la CDR mutante, que, a su vez, puede permitir o facilitar la introducción de un gran número de mutaciones mejoradas. La colección también puede comprender sustitución en las
15 posiciones que no muestran afinidad mejorada en la primera ronda de rastreo.

La segunda colección se rastrea o se selecciona para determinar los miembros de la colección con afinidad de unión mejorada y/o alterada usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo rastreo usando análisis de resonancia en plasmón superficial Biacore, y selección
20 usando cualquier procedimiento conocido en la técnica para la selección, incluyendo la presentación en fagos, presentación de levadura y presentación de ribosomas.

La invención también comprende proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos o polipéptidos de esta
25 invención. En una realización, se proporciona un polipéptido de fusión que

comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de una región de cadena ligera variable mostrada en la SEC ID N.º: 3 y/o al menos 10 aminoácidos de una región de la cadena pesada variable mostrada en la SEC ID N.º: 4 ó 5. En otras realizaciones, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos

5 aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente el 20, al menos aproximadamente 25 o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región de cadena ligera variable y/o al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente el 20, al menos aproximadamente 25, o al menos

10 aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región de la cadena pesada variable. En otra realización, el polipéptido de fusión comprende una o más CDR. Aún en otras realizaciones, el polipéptido de fusión comprende CDR H3 (VH CDR3) y/o CDR L3 (VL CDR3). Para los propósitos de esta invención, una proteína de fusión contiene uno o más anticuerpos y otra secuencia de

15 aminoácidos a la que no está unida en la molécula no nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Secuencias heterólogas ejemplares incluyen, pero no se limitan a una "marca" tal como una marca de FLAG o una marca de 6His. Las marcas se conocen bien en la técnica.

20 Se puede crear un polipéptido de fusión mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, sintética o recombinantemente. Normalmente, se preparan las proteínas de fusión de esta invención preparando y expresando un polinucleótido que los codifica usando procedimientos recombinantes descritos en el presente documento, aunque

25 también se pueden preparar mediante otros medios conocidos en la técnica,

incluyendo, por ejemplo, síntesis química.

Esta invención también proporciona composiciones que comprenden anticuerpos o polipéptidos conjugado (por ejemplo, enlazados) a un agente que facilite el acoplamiento a un soporte sólido (tal como biotina o avidina). Por simplicidad, se hará referencia generalmente a anticuerpos con la comprensión de que estos procedimientos se aplican a cualquier unión de antígeno y/o realizaciones de antagonistas descritas en el presente documento. Conjugación generalmente se refiere a enlazar estos componentes tal como se describe en el presente documento. El enlace (que en general es la fijación estos componentes en asociación próxima al menos para administración) se puede lograr de varias maneras. Por ejemplo, es posible una reacción directa entre un agente y un anticuerpo cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o grupo sulfhidrilo, sobre uno puede reaccionar con un grupo que contenga carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro ácido o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

Un anticuerpo o polipéptido de esta invención se puede enlazar a un agente marcador tales como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o a cualquier otro marcador conocido en la técnica. En la técnica se conocen marcadores que proporcionan generalmente (directa o bien indirectamente) una señal.

La invención también proporciona composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) y kits que comprenden, como esta divulgación deja claro, cualquiera o todos los anticuerpos y/o polipéptidos descritos en el presente documento.

La invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos y los péptidos de la invención, y vectores y células huésped que comprenden el polinucleótido.

En otro aspecto, la invención proporciona polinucleótidos que codifican
5 cualquiera de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) y polipéptidos descritos en el presente documento, tales como anticuerpos y polipéptidos que tienen dañada la función efectora. Los polinucleótidos se pueden preparar y expresar mediante procedimientos conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones (tales como
10 composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En algunas realizaciones, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo tal como se describe en el presente documento. En otra realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende
15 un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos y polipéptidos descritos en el presente documento. Aún en otras realizaciones, la composición comprende uno o ambos de los polinucleótidos mostrados en SEC ID N.º: 23 y SEC ID NO: 24. Vectores de expresión, y administración de composiciones de polinucleótido se describen adicionalmente en el presente documento.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para preparar cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento.

Los polinucleótidos complementarios a cualquiera de tales secuencias también están comprendidos por la presente invención. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificante o antisentido) o bicatenarios, y pueden
25 ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o de ARN. Las moléculas

de ARN incluyen moléculas de HnRNA, que contienen intrones y que corresponden a una molécula de ADN de una manera individualizada, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Las secuencias codificantes o no codificantes pueden estar presentes, pero no es necesario, dentro de un
5 polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede estar enlazado, pero no es necesario, a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos puede comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una parte del mismo) o puede comprender una variante de esta secuencia. Las variantes de
10 polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones de tal forma que la inmunorreactividad del polipéptido codificado no está disminuida, en relación con una molécula inmunorreactiva nativa. El efecto sobre la inmunorreactividad del polipéptido codificado generalmente se puede evaluar tal como se describe en el presente documento. Preferiblemente, las
15 variantes presentan al menos aproximadamente una identidad del 70%, más preferiblemente, al menos aproximadamente una identidad del 80%, aún más preferiblemente, al menos aproximadamente una identidad del 90%, y lo más preferiblemente, al menos aproximadamente una identidad del 95% con una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo nativo o una porción
20 del mismo.

Se dice que dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean su correspondencia máxima tal como se describe a continuación. Normalmente las comparaciones entre dos secuencias
25 se lleva a cabo comparando las secuencias sobre una ventana de comparación

para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, normalmente de 30 a aproximadamente 75, o de 40 a aproximadamente 50, en el que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que la dos secuencias estén óptimamente alineadas.

El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se puede llevar a cabo usando el programa Megalign en el grupo Lasergene de software bioinformático (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando parámetros por defecto. Este programa abarca varios esquemas de alineación descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure (National Biomedical Research Foundation, Washington DC), Vol. 5, Supl. 3, páginas 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenies páginas 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, (Academic Press, Inc., San Diego, CA); Higgins, D.G. y Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. y Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy (Freeman Press, San Francisco, CA); Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Preferiblemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de

comparación de al menos 20 posiciones, en la que la parte de la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, normalmente del 5 al 15 por ciento o del 10 al 12 por ciento, en comparación
5 con las secuencias de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones idénticas en las que las bases de ácidos nucleicos idénticos o el residuo aminoacídico se producen en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones emparejadas, dividiendo
10 el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Las variantes también o alternativamente, pueden ser sustancialmente homólogas a un gen nativo, o una porción o complemento del mismo. Tales
15 variantes de polinucleótidos pueden hibridar en condiciones moderadamente restrictivas a secuencia de ADN que se produce de manera natural que codifica un anticuerpo nativo (o una secuencia complementaria).

"Condiciones moderadamente restrictivas" adecuadas incluyen prelavado en una solución de 5 X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridar a
20 50°C-65°C, 5 X SSC, durante toda una noche; seguido de lavar dos veces a 65°C durante 20 minutos con cada una de 2X, 0,5X y 0,2X SSC que contiene SDS al 0,1%.

Tal como se usa en el presente documento, "condiciones altamente rigurosas" o "condiciones altamente restrictivas" son aquellas que: (1) emplean
25 fuerza iónica baja y temperatura alta para lavar, por ejemplo cloruro de sodio

0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecil sulfato de sodio al 0,1% a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) albúmina sérica bovina al 0,1%/Ficol al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato de sodio 50 mM a 5 pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (3) emplean formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1%, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y formamida al 50% a 55°C, seguido de lavado de 10 alta rigurosidad constituido por 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C. El experto en la técnica reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para adaptar factores tales como longitud de sonda y similares.

15 Se apreciará por los expertos en la técnica que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido tal como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos portan homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. Sin embargo, los polinucleótidos que 20 varían debido a diferencias en el uso de codón están contemplados específicamente por la presente invención. Adicionalmente, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionados en el presente documento están dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que están alterados como resultado de una o más 25 mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos.

La proteína y el ARNm resultante pueden tener, pero no es necesario, una función o estructura alterada. Los alelos se pueden identificar usando técnicas estándar (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias de datos).

5 Los polinucleótidos de esta invención se pueden obtener usando síntesis química, procedimientos recombinantes o PCR. Los procedimientos de síntesis química de polinucleótidos se conocen bien en la técnica y no es necesario describirlos en detalle en el presente documento. Un experto en la técnica puede usar las secuencias que se proporcionan en el presente documento y un
10 sintetizador de ADN comercial puede producir una secuencia de ADN deseada.

 Para preparar polinucleótidos usando procedimientos recombinantes, se puede insertar un polinucleótido que comprende una secuencia deseada dentro de un vector adecuado, y a su vez, el vector se puede introducir dentro de una célula huésped adecuada para replicación y amplificación, tal como se discute
15 adicionalmente en el presente documento. Los polinucleótidos se pueden insertar en células huésped mediante cualquier medio conocido en la técnica. Las células se transforman introduciendo un polinucleótido exógeno mediante captación directa, endocitosis, transfección, apareamiento-F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno se puede mantener dentro de la
20 célula como un vector no integrado (tal como un plásmido) o integrar en el genoma de la célula del huésped. El polinucleótido amplificado de esta manera se puede aislar a partir de la célula huésped mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, supra.

 Alternativamente, la PCR permite la reproducción de secuencias de
25 ADN. La tecnología de PCR se conoce bien en la técnica y se describe en las

patentes de los EE.UU. N.^{os} 4.683.195, 4.800.159, 4.683.202 y 4.754.065, así como PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis y col., 1994, eds. (Birkauswer Press, Boston, MA).

5 Puede obtenerse ARN usando el ADN aislado en un vector apropiado e insertándolo en una célula huésped adecuada. Cuando se replica la célula y el ADN se transcribe en ARN, entonces, se puede aislar el ARN usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, tal como se expone en Sambrook y col., 1989, ant., por ejemplo.

10 Los vectores de clonación adecuados se pueden construir de acuerdo con técnicas estándar, o se pueden seleccionar a partir de un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. Mientras que el vector de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped que se desea usar, los vectores de clonación útiles generalmente tendrán la capacidad de auto-replicarse, pueden poseer una única diana para una endonucleasa de
15 restricción particular, y/o pueden portar genes para un marcador que se puede usar para seleccionar los clones que contienen el vector. Ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK +) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fago, y vectores transportadores tales como pSA3 y
20 pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles a partir de vendedores comerciales tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

En general, los vectores de expresión son construcciones de polinucleótidos replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la invención. Está implícito que un vector de expresión debe ser replicable en las
25 células huésped como episomas o bien como una parte integral del ADN

cromosómico. Vectores de expresión adecuados incluyen pero no se limitan a plásmidos, vectores víricos, incluyendo adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos, y vector(es) de expresión dados a conocer en la publicación PCT N.º WO 87/04462. En general, los componentes de los

5 vectores pueden incluir, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control transcripcional adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminador). Para la expresión (es decir, la traducción), normalmente también se requieren uno o más elementos de control

10 traduccional, tales como sitios de unión a ribosoma, sitios de iniciación de traducción y codones de parada.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés se pueden introducir en la célula huésped mediante cualquiera de un número de medios apropiados, incluidos electroporación, transfección empleando cloruro de

15 calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, u otras sustancias; bombardeo con microproyectiles; lipofección; e infección (por ejemplo, en la que vector es un agente infeccioso tales como el virus de la vacuna). La elección de introducir vectores o polinucleótidos dependerá frecuentemente de las características de la célula huésped.

20 La invención también proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento. Se puede usar cualquier célula huésped que pueda sobreexpresar ADN heterólogo para el propósito de aislar los genes que codifican el anticuerpo, el polipéptido o la proteína de interés. Ejemplos no limitantes de células huésped de mamífero

25 incluyen pero no se limitan a células COS, HeLa, NSO y CHO. Véase también

la publicación PCT N.º WO 87/04462. Células huésped distintas de mamífero adecuadas incluyen procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levadura (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*). Preferiblemente, las células huésped expresan los ADNC a un nivel de aproximadamente 5 veces más alta, 5 más preferiblemente, 10 veces más alta, incluso más preferiblemente, 20 veces más alta que aquella de la del correspondiente anticuerpo endógeno o proteína de interés, si está presente, en las células huésped. El rastreo de las células huésped para una unión específica a antígeno se lleva a cabo mediante un inmunoanálisis o FACS. Se puede identificar una célula que sobreexpresa el 10 anticuerpo o proteína de interés.

C. Composiciones

Las composiciones usadas en los procedimientos de la invención comprenden una cantidad efectiva de un anticuerpo dependiente de pH o un 15 polipéptido derivado de anticuerpo dependiente de pH, descrito en el presente documento. Ejemplos de tales composiciones, así como cómo formularlas, también se describen en una sección anterior y a continuación. En una realización, la composición comprende uno o más anticuerpos dependientes de pH. En otras realizaciones, el anticuerpo dependiente de pH reconoce el 20 PCSK9 humano. Aún en otras realizaciones, el anticuerpo dependiente de pH es humanizado. Aún en otras realizaciones, el anticuerpo dependiente de pH comprende una región constante que no activa una respuesta inmunitaria no deseada o no querida, tal como una lisis mediada por anticuerpo o CCDA. En otras realizaciones, el anticuerpo dependiente de pH comprende una o más 25 CDR del anticuerpo (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco, o, en algunas

realizaciones, las seis CDR). En algunas realizaciones, el anticuerpo dependiente de pH es humano.

La composición usada en la presente invención pueden comprender adicionalmente vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes o
5 estabilizadores (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20a Ed., 2000, Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones, y pueden comprender tampones tales como
10 fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-
15 cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparragina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextranos;
20 agentes quelantes tales como EDTA, azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteínas); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Excipientes farmacéuticamente aceptables se describen adicionalmente
25 en el presente documento.

- En una realización, el anticuerpo se administra en una formulación como una solución acuosa estéril que tiene un pH que varía desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 6,5 y que comprende de desde aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 200 mg/ml de anticuerpo, desde
- 5 aproximadamente 1 milimolar hasta aproximadamente 100 milimolar de tampón de histidina, desde aproximadamente 0,01 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml de polisorbato 80, desde aproximadamente 100 milimolar hasta aproximadamente 400 milimolar de trehalosa y desde aproximadamente 0,01 milimolar hasta aproximadamente 1,0 milimolar de EDTA disódico dihidratado.
- 10 También se puede usar el anticuerpo dependiente de pH y composiciones del mismo junto con otros agentes que sirven para potenciar y/o complementar la eficacia de los agentes.

D. Kits

- 15 La invención también proporciona kits para su uso en los procedimientos actuales. Los kits de la invención incluyen uno o más contenedores que comprenden un anticuerpo dependiente de pH (tal como un anticuerpo humanizado) o péptido descritos en el presente documento e instrucciones para su uso de acuerdo con cualquiera de los procedimientos de la invención
- 20 descritos en el presente documento. En general, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración del anticuerpo dependiente de pH para los tratamientos terapéuticos descritos anteriormente.

- En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es humano. En otras realizaciones, el
- 25 anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Las instrucciones referidas al uso de

- un anticuerpo dependiente de pH incluyen generalmente información de dosificación, del programa de dosificación y de la vía de administración para el tratamiento deseado. Los contenedores pueden ser dosis unitarias, envases a granel (por ejemplo, envases de múltiples dosis) o dosis subunitarias. Las
- 5 instrucciones suministradas en los kits de la invención normalmente son instrucciones escritas en un prospecto o etiqueta (por ejemplo, una lámina de papel incluida en el kit), pero también son aceptables las instrucciones legibles a máquina (por ejemplo, instrucciones realizadas en un disco de almacenamiento óptico o magnético).
- 10 Los kits de esta invención están en un envase adecuado. Los envases adecuados incluyen, pero no se limita a, viales, botellas, botes, envases flexible (por ejemplo, bolsas de plásticos o Mylar sellados), y similares. También se contemplan los envases para su uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, dispositivo de administración nasal (por
- 15 ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede horadarse mediante una aguja de inyección hipodérmica). El contenedor también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el contenedor
- 20 puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede horadarse mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo dependiente de pH. El contenedor (por ejemplo, jeringa prellenada o autoinyector) puede comprender adicionalmente un segundo agente farmacéuticamente activo.
- 25 Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales

tales como tampones e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un contenedor y una etiqueta u prospecto(s) en o asociado con el contenedor.

5 Mutaciones y Modificaciones

Para expresar los anticuerpos de la presente invención, los fragmentos de ADN que codifican regiones V_H y V_L se pueden obtener en primer lugar usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. También se pueden introducir diversas modificaciones, por ejemplo, mutaciones, delecciones y/o adiciones dentro de la secuencias de ADN usando procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la mutagénesis usando procedimientos estándar, tales como mutagénesis mediada por PCR, en los que los nucleótidos mutados están incorporados dentro de los cebadores de PCR de tal forma que el producto de la PCR contiene las mutaciones deseadas o la mutagénesis dirigida a sitio.

Un tipo de sustitución, por ejemplo, que se pueden hacer es la de cambiar una o más cisteínas en el anticuerpo, que puede ser químicamente reactivas, por otro residuo, tal como, sin limitación, alanina o serina. Por ejemplo, puede haber una sustitución de una cisteína no canónica. Se puede hacer la sustitución en una CDR o una región estructural de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. En algunas realizaciones, la cisteína es canónica.

También se pueden modificar los anticuerpos, por ejemplo, en los dominios variables de las cadenas pesadas y/o ligeras, por ejemplo, para alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, se puede hacer

una mutación en una o más de las regiones CDR para incrementar o disminuir la K_D del anticuerpo por el antígeno, para incrementar o disminuir la k_D , o para alterar la especificidad de unión del anticuerpo. Las técnicas en mutagénesis dirigida a sitio son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook
5 y col. y Ausubel y col., supra.

También se puede hacer una modificación o mutación en una región estructural o dominio constante para incrementar la semivida de un dependiente de pH. Véase, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 00/09560. También se puede hacer una mutación en una región estructural o dominio
10 constante para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo, para proporcionar un sitio para unión covalente o no covalentes a otra molécula, o para alterar tales propiedades como fijación de complemento, unión a FcR y citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. De acuerdo con la invención, una único anticuerpo puede tener mutaciones en una cualquiera o en más de
15 las CDR o regiones estructurales del dominio variable o en el dominio constante.

En un proceso conocido como "germinación", ciertos aminoácidos en las secuencias de V_H y V_L se pueden mutar para que se emparejen con las que se encuentran de forma natural en las secuencias de V_H y V_L de línea germinal. En
20 particular, las secuencias de aminoácidos de las regiones estructurales en las secuencias V_H y V_L se pueden mutar para que se emparejen con las secuencias de línea germinal para reducir el riesgo de inmunogenicidad cuando se administra el anticuerpo. Las secuencias de ADN de línea germinal para genes de V_H y V_L humanos se conocen en la técnica (véase por ejemplo, la
25 base de datos de secuencias de línea germinal humana "Base"; véase también

Kabat, E. A., y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publ. N.º:91-3242; Tonino y col., 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798; y Cox y cols., 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836.

5 Otro tipo de sustitución de aminoácidos que se pueden hacer es la de retirar sitios proteolíticos potenciales en el anticuerpo. Tales sitios se pueden producir en una CDR o región estructural de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. La sustitución de residuos de cisteína y la eliminación de sitios proteolíticos puede disminuir el riesgo de heterogeneidad en el producto de anticuerpo y así incrementar su homogeneidad. Otro tipo de
10 sustitución de aminoácidos elimina los pares asparragina-glicina, que forman sitios de desamidación potenciales, alterando uno o ambos de los residuos. En otro ejemplo, se puede escindir la lisina del extremo C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo dependiente de pH de la invención. En diversas
15 realizaciones de la invención, las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos pueden incluir opcionalmente una secuencia señal.

 Una vez se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos de V_H y V_L de la presente invención, estos fragmentos de ADN se pueden manipular adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante
20 estándar, por ejemplo para convertir los genes de región variable a genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, a genes de fragmento Fab o a un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H se enlaza operativamente al otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible.
25 El término "enlazado operativamente", tal como se usa en este contexto, se

pretende que signifique que los dos fragmentos de ADN están unidos de forma tal que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanezcan en el marco.

El ADN aislado que codifica la región V_H se puede convertir en un gen
5 de la cadena pesada de longitud completa enlazando operativamente el ADN que codifica V_H a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de la cadena pesada humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., y col., 1991, Sequences of Proteins of Immunological
10 Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publ. N.º: 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero lo más preferiblemente es una región constante
15 IgG1 o IgG2. La secuencia de región constante de IgG puede ser cualquiera de los diversos alelos o alotipos conocidos que tienen lugar entre diferentes individuos, tales como Gm (1), Gm (2), Gm (3), y Gm (17). Estos alotipos representan una sustitución de aminoácidos naturales que se produce de manera natural en las regiones constantes de IgG1. Para un gen de cadena
20 pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica V_H se puede enlazar operativamente a otra molécula de ADN que codifica sólo la región constante de la cadena pesada CH1. La región constante de la cadena pesada CH1 se puede derivar de cualquiera de los genes de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V_L se puede convertir en un gen de
25 la cadena ligera de longitud completa (así como un gen de la cadena ligera de

Fab) enlazando operativamente el ADN que codifica V_L con otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, C_L . Las secuencias de genes de región constante de la cadena ligera humanos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., y col., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publ. N.º: 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lamda. La región constante kappa puede ser cualquiera de los diversos alelos conocidos que tienen lugar entre diferentes individuos, tales como Inv(1), Inv(2), e Inv(3). La región constante lambda se pueden derivar de cualquiera de los tres genes lambda.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L están enlazados de forma operativa a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos $(Gly_4-Ser)_3$, de modo que las secuencias V_H y V_L se pueden expresar como una proteína de cadena única contigua, con las regiones V_L y V_H unidas mediante el enlazador flexible (Véase por ejemplo, Bird y cols., 1988, Science 242:423-426; Huston y cols., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty y col., 1990, Nature 348:552-554. El anticuerpo monocatenario puede ser monovalente, si sólo se usa un único V_H y V_L , bivalente, si se usan dos V_H y V_L o polivalente, si se usan más de dos V_H y V_L . Se pueden generar anticuerpos polivalentes o biespecíficos que se unen específicamente a antígeno y a otra molécula.

En otra realización, se puede preparar inmunoconjugado o anticuerpo de fusión que comprende todo o una porción de un anticuerpo de la invención

enlazado a otro polipéptido. En otra realización, sólo los dominios variables del anticuerpo están unidos al polipéptido. En otra realización, el dominio V_H de un anticuerpo está enlazado a un primer polipéptido, mientras que el dominio V_L de un anticuerpo está enlazado a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de un modo tal que los dominios V_H y V_L pueden interactuar entre sí para formar un sitio de unión a antígeno. En otra realización preferida, el dominio V_H se separa del dominio V_L mediante un enlazador de tal forma que los dominios V_H y V_L pueden interactuar entre sí. El anticuerpo V_H -enlazador- V_L se enlaza después al polipéptido de interés. Además, se pueden crear anticuerpos de fusión en los que dos (o más) anticuerpos de cadena individual están enlazados entre sí. Esto es útil si se quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente en una única cadena polipeptídica, o si se quiere crear un anticuerpo biespecífico.

En otras realizaciones, se pueden preparar otros anticuerpos modificados usando anticuerpo dependiente de pH que codifica moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, se pueden preparar “cuerpos Kappa” (Ill y col., 1997, Protein Eng. 10:949-57), “Minicuerpos” (Martin y cols., 1994, EMBO J. 13:5303-9), “Diacuerpos” (Holliger y cols., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448), o “Janusins” (Traunecker y cols., 1991, EMBO J. 10:3655-3659 y Traunecker y cols., 1992, Int. J. Cancer (Supl.) 7:51-52) usando técnicas de biología molecular estándar siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva.

Se pueden producir anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno mediante una variedad de procedimientos incluyendo la fusión de hibridomas o el enlace de fragmentos Fab. Véase, por ejemplo, Songsivilai y

Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, Kostelny y col., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. Además, se pueden formar anticuerpos biespecíficos como “diacuerpos” o “Janusins.” En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se une a dos epítomos diferentes de antígeno. En algunas
5 realizaciones, la anticuerpos modificados descritos anteriormente se preparan usando uno o más de los dominios variables o regiones CDR de un anticuerpo humano proporcionado en el presente documento.

Generación de anticuerpos específicos de antígeno

Se depositó el ADN de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos
10 representativos de la presente invención, 5L1721H23_6L3 y 5L1721H23_6L3H3, en la American Type Culture Collection (ATCC) (bajo los términos de tratado de Budapest) el 22 de diciembre del 2009, y se les asignaron los números de acceso de la tabla 2. Todas las restricciones de la disponibilidad para el público de los plásmidos así depositados se eliminarán
15 irrevocablemente después de la emisión de una patente a partir de la memoria descriptiva de la presente invención. Las referencias de los anticuerpos para las cadenas pesada y ligera de 5L1721H23 _ 6L3 son UC-H5H23 y UC-H5L1721-6L3, respectivamente. Las referencias de los anticuerpos para las cadenas pesada y ligera de 5L1721H23 _ 6L3H3 son UC-H5H23-6H3 y UC-
20 H5L1721-6L3, respectivamente.

Tabla 2

	<u>Referencia de los anticuerpos</u>	<u>Nº de acceso de ATCC</u>
	UC-H5H23	PTA-10547
25	UC-H5H23-6H3	PTA-10548

UC-H5L1721-6L3

PTA-10549

Ejemplos

Ejemplo 1: Modelado de la unión dependiente de pH del anticuerpo al antígeno de PCSK9

Se usó un modelado por ordenador para predecir si un anticuerpo con unión a antígenos dependiente de pH podría repercutir en la semivida del anticuerpo la duración de la disminución de la concentración sérica de PCSK9. Para el propósito de este modelado se hicieron las siguientes asunciones: Una
10 dosis de 1 uM de anticuerpo en sangre; semivida de anticuerpo (no dependiente de pH) de 21 días; una duración de funcionamiento de la simulación de 100 días; para el anticuerpos dependiente de pH, una $K_A = 1e5/M/s$, una K_D a pH neutro = $K_D * K_A$, la unión dependiente de pH se modela como un incremento en K_D en los endosomas ácidos; y K_D a pH ácido = $R * K_D$
15 a pH neutro.

Las tasas de tiempo de cambio de la especie en el modelo se especifican en términos de parámetros de modelo mediante las ecuaciones diferenciales a continuación. En general, se deja que el modelo avance con niveles de anticuerpo ajustados a cero hasta que alcanza un estado
20 estacionario; a ese tiempo, se estimula un bolo de anticuerpo reestableciendo [**mAb**] desde cero hasta un nivel reflector de la dosis, y después permitiendo que el modelo descrito más adelante avance.

Los parámetros usados en el modelo se describen a continuación en la tabla 3. En algunos casos, los parámetros se derivan de otras cantidades
25 medidas o fisiológicamente relevantes; éstas también se indican en la tabla.

Tabla 3 (N) = mAb no dependiente de pH; (AS) = mAb dependiente de pH

Parámetro	Descripción	Valor
V	Volumen de sangre	2 ml
$V_{temprano}$	Volumen de endosoma temprano	0,06 ml
$V_{tardío}$	Volumen de endosoma tardío	0,06 ml
V_{activo}	Volumen de endosoma de captación activo	0,3 ml
$k_{R, creado}$	Velocidad de síntesis de LDLR	0,1 nM/h
$k_{P, creado}$	Velocidad de síntesis de PCSK9	1,714 nM/h
$k_{L, creado}$	Velocidad de síntesis de LDL	10,44 nM/h
$k_{captación activa}$	Velocidad de primer orden de captación de PCSK9 activo	$\ln(2)/t_{captación activa}$
$t_{captación activa}$	Escala temporal para la captación de PCSK9 activo	1 h
$k_{R eliminación}$	Velocidad de eliminación de primer orden para LDLR	$0,1872 \text{ h}^{-1}$
$k_{L, eliminación}$	Velocidad de de eliminación de primer orden para LDL	$0,018054 \text{ h}^{-1}$
$k_{proteína, A}$	Velocidad de asociación de proteína-proteína	$100000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$k_{L, D}$	constante de velocidad de disociación LDL/LDLR	$k_{proteína, A} K_{d, L}$
$K_{d, L}$	Afinidad LDL/LDLR	10 nM
$k_{P, D}$	constante de velocidad de disociación PCSK9/LDLR	$k_{proteína, A} K_{d, P}$
$K_{d, P}$	Afinidad PCSK9/LDLR	170 nM
$k_{internalización}$	Velocidad de internalización de primer orden de LDLR	$\ln(2)/t_{internalización}$
$t_{internalización}$	Escala temporal para la internalización de LDLR	5 min
$k_{de reciclado}$	Velocidad de reciclaje de primer orden de LDLR	$\ln(2)/t_{de reciclado}$
$t_{de reciclado}$	Escala temporal para reciclaje de LDLR	10 min
$k_{A, neutra}$	Velocidad de asociación de anticuerpo/PCSK9 (pH 7,4)	$1,01 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (N)
		$6,37 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (AS)
$k_{D, neutra}$	Velocidad de disociación de anticuerpo/PCSK9 (pH 7,4)	$4,85 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (N)
		$5,16 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (AS)

k_A , ácido	Velocidad de asociación de anticuerpo/PCSK9 (pH 5,5)	$3,73 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (N)
		$1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (AS)
k_D , ácido	Velocidad de disociación de anticuerpo/PCSK9 (pH 5,5)	$1,94 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (N)
		$0,0187 \text{ s}^{-1}$ (AS)
$k_{\text{endocaptación}}$	Velocidad de volumen de captación en endosomas tempranos	8 $\mu\text{l}/\text{min}$
A	Fracción de reciclaje automática	0,7 (sin dimensiones)
F	Eficacia de reciclaje de anticuerpo mediada por FcRn	0,972 (sin dimensiones)
α	Incremento en el tiempo de procesamiento de endosoma activo (comparado con endosomas de fase fluida)	4 (sin dimensiones)

Una representación del modelado se muestra en la figura 1. El incremento de la razón de K_D de pH endosómico (es decir, pH 5,5 ó 6,0)/pH fisiológico 7,4 desde 1 hasta 2 dio como resultado un incremento en la concentración de anticuerpo a lo largo del tiempo, que se correlacionó con el valor de la razón de K_D . Cuando se cambió la razón de K_D , o k_D o k_A , se cambió la concentración de ligando libre de antígeno (figura 2) así como la concentración de anticuerpo (figura 3) en correlación con el incremento de la razón de K_D (figura 2), el incremento de k_D (figura 3A) y la disminución de k_A (figura 3B). Estos resultados no eran dependientes después de la designación de si el pH endosómico era de 5,5 ó de 6,0.

Se construyó una presentación de mapa de calor (figura 4) para un modelo general de anticuerpos con unión dependiente de pH, mostrando de forma efectiva cuántos días más el anticuerpo con unión dependiente de pH debería disminuir la concentración sérica de antígeno sobre lo observado para un anticuerpo no dependiente de pH. Los días de inactivación se definen por la

integral de: $1-(C_{\text{suero}}(t))/(C_{\text{suero}}(t = 0))$ desde el día 0 hasta el día 100, por ejemplo, una reducción del 100% en la concentración sérica durante N días seguido por una vuelta al nivel de pretratamiento correspondería a N días de inactivación. Los mapas de calor muestran el incremento en días de inactivación para los anticuerpos dependientes de pH, en comparación con los anticuerpos de control, en base a la razón de K_D a pH neutro y también a la $K_D(R)$. Se ven los efectos a lo largo de todos los valores de K_D modelados, particularmente entre 0,01 y 100 nM, y más particularmente entre K_D de 0,1 y 10 nM. Los cambios en ciertos parámetros, por ejemplo, tamaño de dosis, cinéticas de anticuerpo, duración de simulación u otras cantidades conducirá a algunas diferencias en los valores mostrados en los mapas de calor.

Las predicciones del modelado para el funcionamiento de anticuerpos de PCSK9, con o sin unión dependiente de pH, correlacionaron bien con los resultados experimentales reales. En la figura 5A, se muestra la concentración de anticuerpo total sobre el tiempo después de administrar el anticuerpo 5A10, que no tiene unión dependiente de pH y una razón de K_D de 1,1. Los niveles de LDL equivalente se muestran en la figura 5B. En la figura 6A, se muestra la concentración de anticuerpo total durante el tiempo después de administrar el anticuerpo 5L1721H23 _ 6L3H3, que tiene unión dependiente de pH y una razón de K_D de 14,4. Los niveles de LDL equivalente también se muestran en la figura 6B. Para estos modelos y experimentos en las figuras 5 y 6, se asume un pH de 5,5 y los valores experimentales de K_D para los anticuerpos se calcularon a pH 5,5. El anticuerpo de unión dependiente de pH demostró concentración de anticuerpo total prolongada y una inhibición prolongada de niveles de LDL en comparación con 5A10. Una descripción adicional del

modelo general para los anticuerpos con unión dependiente de pH se muestra en el ejemplo 4.

5 Ejemplo 2: Generación y rastreo de anticuerpos anti-PCSK9 con unión de PCSK9 dependiente de pH

Se llevó a cabo mutagénesis mediante histidina para todas las CDR del anticuerpo monoclonal h5A10 (también conocido como marco 5A10 hu). Este anticuerpo proviene de anticuerpo monoclonal de ratón 5A10 (también conocido como 5A10.B8), pero tiene regiones estructurales humanas. La
10 secuencia del anticuerpo h5A10 usado como plantilla de partida se muestra a continuación (CDR están en fuente negrita):

Cadena Ligera Variable:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK**ASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASY**
15 **RYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDVATYYCQQRYSTPRTFGQGTKLEI**
K (SEQ ID NO: 1)

Cadena Pesada Variable:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTSYMH**WVRQAPGQGLEWM**GE**
INPSGGRTNYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC**ARERPL**
20 **YAMDYWGQGTTVTVSS** (SEQ ID NO: 2)

Se clonó el anticuerpo h5A10 en un vector de expresión bacteriano, que permite la expresión de Fab en el periplasma de E. coli. Usando cebadores, se mutó cada posición de CDR a histidina, dando como resultado 58 mutantes de
25 histidina individuales del anticuerpo h5A10.

Se expresaron los anticuerpos con estos mutantes de histidina individuales en el periplasma de E. coli después de la inducción con IPTG y se purificó usando una marca de histidina en el extremo C-terminal del CH1. Se midieron las afinidades de Fab purificado a pH 5,5 y 7,4 con Biacore. Se encontraron 5 mutaciones influenciando la razón de K_D de pH 5,5/pH 7,4 en cuatro CDR diferentes (L1, L2, H2 y H3). El cambio dependiente de pH en la K_D varió entre mínimamente disminuido y significativamente disminuido.

Las mutaciones de tres CDR (L1, L2 y H2) incrementaron la razón K_D de pH 5,5/pH 7,4 sin destruir la afinidad a pH 7,4, y se generaron los anticuerpos combinando las CDR que contienen estas mutaciones. Para h5A10 y todos los 10 mutantes, la secuencia de CDR1 (H1) de la cadena pesada es GYTFTSYMH (SEC ID N.º: 6). Para 5A10, los mutantes simples, dobles y triples, y 5L1721H23 _ 6H3, la CDR3 (L3) de cadena ligera, es QQRYSTPRT (SEC ID N.º: 27). Para los otros mutantes con afinidad madurada y mutantes basados 15 en L1L3, L3 es QQRYSLWRT (SEC ID N.º: 12). Las secuencias de CDR de los anticuerpos que contienen estas diversas combinaciones de mutaciones se muestran en la tabla 4 a continuación. Los identificadores de los números de secuencia se proporcionan entre paréntesis.

20

Tabla 4

	L1	L2	H2	H3
h 5A10	KASQDVSTAVA (13)	SASYRYT (17)	EINPSGGRTNYNEKFS (19)	ERPLYAMDY (8)
Mutantes individuales:				
5L-6	KASQDH STAVA (14)			
5L1-7	KASQDVH TAVA (10)			

	L1	L2	H2	H3
5L2-1		HASYRYT (11)		
5L2-4		SASH RYT (18)		
5H2-3			EIH PSGGRTNYNEKFKS (7)	
5H3-5				ERPLH AMDY (21)
Mutantes dobles:				
5L17 21	KASQDVH TAVA (10)	HASYRYT (11)		
5L17 24	KASQDVH TAVA (10)	SASH RYT (18)		
5L17H23	KASQDVH TAVA (10)		EIH PSGGRTNYNEKFKS (7)	
5L21 24		HASHRYT(1 9)		
5L21 H23		HASYRYT (11)	EIH PSGGRTNYNEKFKS (7)	
5L24 H23		SASHRYT(1 8)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	
Mutantes triples:				
5L17 21 H23	KASQDVHTAVA(10)	HASYRYT(1 1)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	
5L17 24 H23	KASQDVHTAVA(10)	SASHRYT(1 8)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	
5L1724H35	KASQDVHTAVA(10)	SASHRYT(1 8)		ERPLHAMDY(21)
Mutantes con afinidad madurada:				
5L1721H23_6H3	KASQDVHTAVA(10)	HASYRYT(1 1)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	ERPLYASDL(9)
5L1721H23_6L3	KASQDVHTAVA(10)	HASYRYT(1 1)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	
5L1724H23_6L3	KASQDVHTAVA(10)	SASHRYT(1 8)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	
5L1721H23_6L3H3	KASQDVHTAVA(10)	HASYRYT(1 1)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	ERPLYASDL(9)
5L1724H23_6L3H3	KASQDVHTAVA(10)	SASHRYT(1 8)	EIHPSGGRTNYNEKFKS(7)	ERPLYASDL(9)
Mutantes basados en L1L3:				
L1L3	RASQGISSALA(15)	SASYRYT(1 7)	EISPFGGRTNYNEKFKS(20)	ERPLYASDL(9)

	L1	L2	H2	H3
6L1721H23	RASQGI H SALA(16)	H ASYRYT(1 1)	EI H PFGGRTNYNEKFKS(7)	
6L1721	RASQGI H SALA(16)	H ASYRYT(1 1)		
6L21H2335		H ASYRYT(1 1)	EI H PFGGRTNYNEKFKS(7)	

No se realizaron cambios en las secuencias estructurales para estos anticuerpos en comparación con 5A10.B8. Por ejemplo, las secuencias para las cadenas pesadas variables de 5L1721H23 _ 6L3 y 5L1721H23 _ 6L3H3 se proporcionan a continuación. Se usó la misma cadena ligera variable en cada uno de estos anticuerpos y también se proporcionan a continuación. Las CDR están destacadas en negrita.

Cadena ligera Variable de 5L1721H23 _ 6L3 y 5L1721H23 _ 6L3H3:

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC**KASQDVHTAV**AWYQQKPGKAPKLLIY**HAS**
YRYTGVPSRFSGSGSGTDFITISLQPEDATYYC**QQRYSLWRT**FGQGTKL
 EIK (SEQ ID NO: 3)

Cadena pesada Variable 5L1721H23 _ 6L3:

15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC**KASGYTFTSY**MHWVRQAPGQGLEWMGE
IHPSGGRTNYNEKF**KSR**VTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYC**ARERPL**
YAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 4)

Cadena pesada Variable 5L1721H23 _ 6L3H3:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGE
IHPSGGRTNYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARERPL
YASDLWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 5)

- 5 **Cadena ligera Variable (kappa) de 5L1721H23 _ 6L3 y 6L3H3 5L1721H23 _**
gatatccagatgacacagtcccatcctccctgtctgcctctgtggcgaccggtcaccatcacctgcaaggc
ctctcaggatgtgcatactgtctagcctggatcagcagaagccaggcaaagcccaaaactgctgatctac
catgcatcctaccgctacactgggtgccatcacgcttcagtggcagtggtctggtacagatttcacctcacca
ttagcagcctgcaaccagaagatattgccacttactgccaagcaacgttatagctgtggcgacgttcggtc
10 aaggcaccaagctggagatcaaa (SEC ID N.º: 23)

Cadena pesada Variable de 5L1721H23_6L3H3

- caggtgcagctggtgcagctggtgctgaggtgaagaagcctggcgctccgtgaaggttcctgcaaagcat
ctggttacaccttaccagctactatatgcactgggtgcgccaagcccctggtcaaggcctggagtggatgggc
15 gagattcatcctagcggcggtcgtactaactacaatgagaagtcaagagccgctgactatgactcgcgata
cctccaccagcactgtctacatggaactgagctctctgcgctctgaggacactgctgtgtattactgtgcccgcg
agcgccccctgtatgctagcgacctgtggggccagggtaccacggtcacgtctcctca (SEC ID N.º:
24)

- 20 Estos anticuerpos se expresaron y purificaron para la determinación de
su K_D a 7,4 y su razón K_D de pH5,5/pH 7,4, tal como se midió sobre un
biosensor de resonancia de plasmón superficial Biacore 3000 equipado con
una chip sensor de calidad para investigación usando un tampón de
desplazamiento HBS-EP (Biacore AB, Uppsala, Suecia – ahora GE
25 Healthcare). Se acoplaron con amina IgG anti-Ms policlonales de conejo a

niveles de saturación sobre el chip usando una química de N-hidroxisuccinimida/etildimetilaminopropilcarbodiimida (NHS/EDC) estándar. El tampón se forma atmosférica a HBS-EP+1 mg/ml de BSA+1 mg/ml CM-dextrano. Se diluyeron IgG de PCSK9 de longitud completa hasta

5 aproximadamente 15 µg/ml y se capturó durante 1 min a 5 µ l/min para dar niveles de aproximadamente 500RU por célula de flujo, dejando un blanco para servir como canal de referencia. Se inyectaron hPCSK9 3,73-302 nM o mPCSK9 2,54-206 nM como una serie de 3 veces de 5 miembros durante 1 min a 100 µl/min. Se monitorizó la disociación durante 5 min. Se regeneró el

10 chip después de la última inyección de cada valoración con dos pulsos de 30 segundos de ácido fosfórico 100 mM. Los ciclos de tampón proporcionan blancos para referenciar doblemente los datos, que se ajustaron después globalmente a un modelo de unión simple usando software de Biaevaluation v.4.1. Se dedujeron las afinidades a partir del cociente de las constantes de

15 velocidad cinética ($K_D = k_D/k_A$). Los resultados para la afinidad de PCSK9 humano se muestran en la tabla 5, y los resultados para la afinidad de PCSK9 de ratón se muestran en la tabla 6. Estos datos muestran que los anticuerpos se pueden diseñar y seleccionar para tener afinidad más alta por PCSK9 humano o de ratón a pH 7,4, y una afinidad inferior a pH 5,5.

20

Tabla 5. Afinidades de unión para los anticuerpos anti-PCSK9 que se unen a PCSK9 humano a pH 7,4 y 5,5.

huPCS K9 pH 7,4				huPCS K9 pH 5,5				pH 5,5/7,4
kon (1/Ms)	Koff (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	kon (1/Ms)	Koff (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	KD

6L1721	3,29E+04	7,08E-05	880	2,2	1,66E+05	8,40E-04	1059	5,1	2,3
5A10.B8	4,38E+04	1,04E-04	1080	2,4	1,31E+05	3,91E-04	1020	3,0	1,3
5L1721H23_6L3H3	4,42E+04	1,72E-04	934	3,9	8,28E+04	4,80E-03	1430	58	14,9
6L1721H23	5,02E+04	2,01E-04	645	4,0	1,10E+05	2,61E-03	1140	24	6
5L1721H23_6L3	3,09E+04	2,14E-04	974	6,9	6,45E+04	0,0166	1320	257	37,2
5L1721H23_6H3	3,74E+04	2,73E-04	461	7,3	1,41E+05	7,72E-03	398	55	7,5
5L1721H23	3,17E+04	3,99E-04	990	13	1,24E+05	0,0179	1030	144	11,1
5L1724H23_6L3H3	2,23E+04	3,42E-04	1020	15	9,55E+04	7,89E-03	1500	83	5,5
5L1724H23_6L3	3,59E+04	7,90E-04	910	22	7,54E+04	0,0407	1050	540	24,5
6L21H2335	5,81E+04	7,33E-03	892	126	6,55E+05	2,38E-01	624	363	2,9
5L1724H23	-	-	20	-	2,03E+05	7,93E-03	114	39	
5L1724H35	-	-	40	-	-	-	0	-	

Tabla 6. Afinidades de unión para los anticuerpos anti-PCSK9 que se unen a PCSK9 de ratón a pH 7,4 y 5,5.

	msPCSK9 pH 7,4				msPCSK9 pH 5,5				huPCSK9 pH 5,5/7,4
	kon (1/Ms)	Koff (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	kon (1/Ms)	Koff (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	KD
6L1721	8,80E+04	2,28E-04	1260	2,6	3,38E+05	1,77E-03	1120	5,2	2,0
5A10_WT	1,01E+05	4,85E-04	1410	4,8	3,73E+05	1,94E-03	1050	5,2	1,1
5L1721H23_6L3H3	6,37E+04	5,16E-04	1630	8,1	1,60E+05	0,0187	1420	117	14,4
6L1721H23	6,48E+04	4,69E-04	1230	7,2	2,04E+05	7,29E-03	1220	36	5,0
5L1721H23_6L3	4,75E+04	6,76E-04	1600	14	1,05E+05	0,0428	1360	408	29,1
5L1721H23_6H3	1,13E+05	8,99E-04	615	8,0	3,07E+05	0,0341	460	111	13,9
5L1721H23	6,12E+04	1,41E-03	1380	23	1,02E+05	0,0588	1100	576	25,0
5L1724H23_6L3H3	6,31E+04	8,27E-04	1690	13	2,11E+05	0,0263	1520	125	9,6
5L1724H23_6L3	5,31E+04	2,18E-03	1440	41	1,60E+05	0,121	1100	756	18,4
6L21H2335	8,99E+04	1,72E-02	1340	191	5,26E+05	0,237	502	451	2,4
5L1724H23	-	-	40	-	2,73E+05	2,02E-02	91	74	
5L1724H35	4,43E+04	1,53E-03	164	35	-	-	0	-	

Afinidad y parámetros cinéticos para los anticuerpos de PCSK9 h5A10 y 5L1721H23 _ 6L3H3 así como el anticuerpo de PCSK9 H1M300N (véase el documento US2010/0166768, por ejemplo, en la tabla 7). Todos los
5 experimentos se realizaron en un biosensor Biacore 2000.

Se preparó un chip sensor de Fc anti-humana activando todas las células de flujo de un chip sensor CM4 Biacore con una mezcla 1:1 (v/v) de EDC 400 mM y NHS 100 mM durante 7 minutos, a un caudal de 10 µl/minuto. Un reactivo de Fc anti-humano (Fragmento F(AB')₂ de cabra 2 a Fc de IgG
10 Humano, N.º de catálogo de Cappel: 55053) se diluyó a 60 µg/ml en acetato de sodio 10 mM pH 5,0 y se inyectó en todas las células de flujo durante 7 minutos a 20 µl/minuto. Se bloquearon todas las células de flujo con etilendiamina 100 mM en tampón borato 150 mM, pH 8,5, durante 7 minutos a 10 µl/minuto.

Se hizo funcionar el ensayo cinético usando una metodología de
15 valoración cinética tal como se describe en Karlsson y col., Anal. Biochem 349 , 136-147 (2006).

Se capturó el mismo anticuerpo (por ejemplo, 5L1721H23 _ 6L3H3) sobre células de flujo aguas en dirección 3' (células de flujo 2, 3 y 4) a 2 µg/ml a un caudal de 10 µl/min durante 30 segundos, 60 segundos y 120 segundos
20 para las células de flujo 2, 3 y 4 respectivamente. Se usó la célula de flujo 1 como superficie de referencia. Después de la captura de anticuerpos, se inyectó PCSK9 a 30 µl/min sobre todas las células de flujo en una serie de inyecciones de concentración baja a alta. La concentración superior era de PCSK9 200 nM y el factor de dilución era de 3 veces. Cada inyección de
25 PCSK9 era de dos minutos, el tiempo de disociación después de la inyección

de PCSK9 200 nM era de 20 minutos. Se realizó un grupo similar de inyecciones con tampón de desplazamiento en lugar de PCSK9 para propósitos de referenciación doble (referenciación doble tal como se describe en Myszk, J. Mol. Recognit 12 , 279-284, 1999). Después de cada ciclo de análisis se
5 regeneraron todas las células de flujo con tres inyecciones de 30 segundos de ácido fosfórico 75 mM. Se ajustaron globalmente los sensogramas a partir de las células de flujo 2 y 3 para un par PCSK9/anticuerpo dado a un Langmuir 1:1 simple con un modelo de unión de transporte de masa.

Se realizaron los experimentos a pH 6,0 y 7,4 usando muestra y
10 tampones de desplazamiento de fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, Tween-20 al 0,05%, pH 6 y fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, Tween-20 al 0,05%, pH 7,4, respectivamente.

Tabla 7. Unión dependiente de pH

Anticuerpo	pH 6,0 (fosfato de sodio)				pH 7,4 (fosfato de sodio)				razones	
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	K_D (pM)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	K_D (pM)	K_D , pH 6/ K_D , pH 7,4	k_d , pH 6/ k_d , pH 7,4
5A10_WT	3,31E+05	< 6E-5	< 193	< 181	2,41E+05	< 6E-05	< 193	< 249		
5L1721H_23										
6L3H3	3,07E+05	2,86E-03	4,0	9316	2,42E+05	1,74E-04	66,4	719	13,0	16,4
H1M300N	4,27E+05	3,21E-04	36,0	752	1,67E+05	6,92E-05	166,9	414	1,8	4,6

15 Ejemplo 3: Los anticuerpos de unión de PCSK9 dependiente de pH tienen un efecto farmacodinámico prolongado en la disminución del colesterol

A. Los anticuerpos de antagonista de unión de PCSK9 dependiente de pH disminuyen el colesterol sérico durante una duración prolongada en ratones

20 Para determinar si los anticuerpos de antagonista de unión de PCSK9

dependiente de pH pueden disminuir los niveles de colesterol in vivo durante una duración prolongada en comparación con anticuerpos no dependientes de pH, se sometieron a prueba los efectos del curso temporal de anticuerpos sensibles a ácidos 5L1721H23_6H3 y 5L1721H23_6L3H3 y anticuerpos no sensibles a ácidos h5A10 (sólo dosificados a 10 mg/kg) y 5A10.B8 sobre colesterol sérico cuando se inyectan a 1, 3, ó 10 mg/kg en ratones. Los cuatro anticuerpos tienen afinidades de unión similares de 5-14 nM a pH neutro (PH 7,4) a PCSK9 de ratón. Los anticuerpos 5L1721H23 _6H3 y 5L1721H23 _6L3H3 tienen afinidades reducidas de 117nM y 408nM, respectivamente, a pH 5,5, mientras que h5A10 y 5A10.B8 tienen una K_D a pH 5,5 similar a la de 7,4 (5,2 nM). Se mantuvieron ratones C57/bl6, de 6 a 7 semanas de edad, en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, se extrajo sangre para recoger aproximadamente 70 μ l de suero en el día 7. Se inyectaron por vía IV anticuerpos de PCSK9 de antagonista y un anticuerpo monoclonal de apareamiento de isotipo de control que no se une a ninguna proteína de mamífero conocida en ratones C57/bl6 macho de 7 semanas de edad y se recogieron muestras de suero en los días 5, 12, 19, 26, 61, y 75 después la inyección. Se analizaron todas las muestras de suero para determinar el colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL sobre el instrumento Ace Alera (Alfa Wassermann, West Caldwell, NJ) y se calcularon los niveles de colesterol de LDL usando la ecuación Friedewald. La figura 7 muestra una disminución rápida y dependiente de dosis en los niveles de colesterol totales después de la inyección de un anticuerpo de antagonista de PCSK9. Los niveles de colesterol de LDL en ratones eran demasiado bajos para medirse y calculare de forma fiable. Con una dosis de 10 mg/kg, los cuatro anticuerpos redujeron el

colesterol de HDL en un 35-40% en los días 5 y 12, mientras que los animales inyectados con 5L1721H23_6H3 y 5L1721H23_6L3H3 no se recuperaron hasta el día 61. Los animales inyectados con h5A10 y 5A10.B8 volvieron a niveles de línea base en los días 26 y 33, respectivamente.

5

B. Los anticuerpos de unión de PCSK9 dependiente de pH tienen una semivida prolongada en ratones

Se determinaron con concentraciones de suero de anticuerpos en el mismo estudio descrito en el ejemplo b para determinar si los anticuerpos anti-
10 PCSK9 sensibles al pH daban como resultado una semivida de anticuerpo prolongada. Los anticuerpos anti-PCSK9 normales tales como h5A10 y 5A10.B6 tienen una semivida más corta dependiente de dosis en comparación con los anticuerpos que se unen a otros antígenos solubles, debido a la degradación mediada por PCSK9 del complejo anticuerpo/antígeno. Tal como
15 se muestra en la figura 8A, la propiedad de unión dependiente de pH redujo la degradación de anticuerpo y prolongó la semivida de los anticuerpo anti-PCSK9 5L1721H23_6H3 y 5L1721H23_6L3H3. Para demostrar adicionalmente que la prolongación de PK de 5L1721H23_6H3 y 5L1721H23_6L3H3 era resultado de la disminución de la eliminación mediada por PCSK9 de los
20 anticuerpos, se llevó a cabo un estudio de curso temporal similar en ratones inactivados en PCSK9. Las diferencias en las concentraciones de anticuerpo de suero y las velocidades de reducción entre los anticuerpos sensible y no sensibles a pH eran insignificantes hasta que se inyectaron 3 mg/kg de PCSK9 humana en los ratones. Después de esta inyección, los anticuerpos de PCSK9
25 no sensibles a PH demostraron un incremento en la degradación en

comparación con los anticuerpos sensibles a PH y el anticuerpo de control negativo (figura 8B). Estos resultados indican que la disminución observada en la degradación de anticuerpos de PCSK9 de unión de PCSK9 dependiente de pH resultan de la disociación del anticuerpo de PCSK9 y, por lo tanto, del rescate del anticuerpo de la degradación mediada por PCSK9.

C. Los anticuerpos de antagonista de PCSK9 sensible a pH disminuyen el colesterol sérico durante una duración prolongada en monos

La figura 9B ilustra el efecto de los anticuerpos de antagonista de anti-PCSK9 sensible a PH, 5L1721H23_6H3 y 5L1721H23_6L3H3, y el anticuerpo anti-PCSK9 no sensible L1L3 sobre los niveles de colesterol de LDL sérico de macacos de Java como porcentaje de control. Los anticuerpos (1,5mg/kg de cada) se administraron el día 0 a macacos de Java hembras por medio de inyección en bolo i.v.. El colesterol de LDL se redujo hasta un 50% de la línea base por día en los tres grupos tratados con anticuerpo. Mientras que los niveles de colesterol de LDL volvían a la línea base en el día 10 después de la administración de anticuerpo no sensible a pH, el colesterol de LDL se mantenía suprimido hasta el día 21 en monos tratados con anticuerpos sensibles a pH. Los niveles HDL permanecían esencialmente sin cambios como resultado del tratamiento con anticuerpos (figura 9A). La figura 10 demuestra que la semivida de anticuerpos anti-PCSK9 sensibles a pH se prolongaba en comparación con L1L3 no sensible a pH.

Ejemplo 4: Modelado General para anticuerpos con unión a antígenos dependiente de pH Se usó un modelado de ordenador para predecir si un

anticuerpo con unión dependiente de pH a su antígeno genérico podría repercutir en la semivida del anticuerpo y/o en la duración de la disminución de la cantidad de antígeno o la concentración sérica. Para los propósitos de este modelado, se hicieron las siguientes asunciones: 1) anticuerpo, dosis 1 uM de anticuerpo en sangre, semivida de anticuerpo de 21 días; 2) funcionamiento de simulación durante 100 días; unión a anticuerpo y unión dependiente de pH, $K_A = 1e5/M/s$, K_D a pH neutro = $K_D * K_A$; la unión dependiente de pH se modela como un incremento en K_D en los endosomas ácidos, K_D a pH ácido = $R * K_D$ a pH neutro.

La figura 15 detalla el modelo de tráfico para anticuerpos con unión dependiente de pH usado para el modelado y las ecuaciones que definen el modelo son como sigue:

$$\begin{aligned}d/dt(Dosis\_Normal) &= - k\_dist * Dosis\_Normal \\ \\d/dt(mAb) &= k\_dist * Dosis\_Normal - (mAb * kon * Antígeno\_normal) + (kon * KD * \\mAb\_antígeno) &- k\_sangre\_endo * mAb / V_{Norm} + f1 * k\_sangre\_endo * mAb\_e / V_{Norm} \\ &+ (1-f1) * f2 * k\_sangre\_endo * mAb\_le / V_{Norm} \\ \\d/dt(mAb\_antígeno) &= (mAb * kon * Antígeno\_normal) - (kon * KD * mAb\_antígeno) \\ &- k\_sangre\_endo * mAb\_antígeno / V_{Norm} + f1 * k\_sangre\_endo * mAb\_antígeno\_e / \\ &V_{Norm} + (1-f1) * f2 * k\_sangre\_endo * cmplx\_le / V_{Norm} \\ \\d/dt(Antígeno\_normal) &= - (mAb * kon * Antígeno\_normal) + (kon * KD * \\mAb\_antígeno) &+ ln(2) / Semivida\_antígeno * nivel\_antígeno - \\ &ln(2) / Semivida\_antígeno * Antígeno\_normal -\end{aligned}$$

$$k_{\text{sangre\_endo}} \cdot \text{Antígeno\_normal} / V_{\text{Norm}} + f1 \cdot$$

$$k_{\text{sangre\_endo}} \cdot \text{Endosomas\_antígeno\_e} / V_{\text{Norm}}$$

$$\begin{aligned} d/dt (mAb\_e) = & k_{\text{sangre\_endo}} \cdot mAb / V_{\text{Endo}} - f1 \cdot k_{\text{sangre\_endo}} \cdot mAb\_e / V_{\text{Endo}} \\ 5 \quad & - (mAb\_e \cdot kon \cdot \text{Endosomas\_antígeno\_e}) + (kon \cdot KD \cdot mAb\_antígeno\_e) - (1-f1) \\ & \cdot k_{\text{sangre\_endo}} \cdot mAb\_e / V_{\text{Endo}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} d/dt (mAb\_antígeno\_e) = & k_{\text{sangre\_endo}} \cdot mAb\_antígeno / V_{\text{Endo}} - \\ & f1 \cdot k_{\text{sangre\_endo}} \cdot mAb\_antígeno\_e / V_{\text{Endo}} + \\ 10 \quad & (mAb\_e \cdot kon \cdot \text{Endosomas\_antígeno\_e}) - (kon \cdot KD \cdot mAb\_antígeno\_e) - (1-f1) \\ & \cdot k_{\text{sangre\_endo}} \cdot mAb\_antígeno\_e / V_{\text{Endo}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} d/dt (\text{Endosomas\_antígeno\_e}) = & k_{\text{sangre\_endo}} \cdot \text{Antígeno\_normal} / V_{\text{Endo}} - \\ & f1 \cdot k_{\text{sangre\_endo}} \cdot \text{Endosomas\_antígeno\_e} / V_{\text{Endo}} - \\ 15 \quad & (mAb\_e \cdot kon \cdot \text{Endosomas\_antígeno\_e}) + (kon \cdot KD \cdot mAb\_antígeno\_e) - (1-f1) \\ & \cdot k_{\text{sangre\_endo}} \cdot \text{Endosomas\_antígeno\_e} / V_{\text{Endo}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} d/dt (mAb\_le) = & -(1-f1) \cdot f2 \cdot k_{\text{sangre\_endo}} \cdot mAb\_le / V_{\text{LEndo}} + (1-f1) \\ & \cdot k_{\text{sangre\_endo}} \cdot mAb\_e / V_{\text{LEndo}} - (mAb\_le \cdot kon \cdot \text{Antígeno\_le}) + (R \cdot kon \cdot KD \cdot \\ 20 \quad & cplx\_le) - (1-f1) \cdot (1-f2) \cdot k_{\text{sangre\_endo}} \cdot mAb\_le / V_{\text{LEndo}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} d/dt (cplx\_le) = & -(1-f1) \cdot f2 \cdot k_{\text{sangre\_endo}} \cdot cplx\_le / V_{\text{LEndo}} + (1-f1) \\ & \cdot k_{\text{sangre\_endo}} \cdot mAb\_antígeno\_e / V_{\text{LEndo}} + (mAb\_le \cdot kon \cdot \text{Antígeno\_le}) - \\ & (R \cdot kon \cdot KD \cdot cplx\_le) - (1-f1) \cdot (1-f2) \cdot k_{\text{sangre\_endo}} \cdot cplx\_le / V_{\text{LEndo}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} d/dt(\text{Antígeno}_{le}) = & + (1-f1) *k_{sangre\_endo} *Endosomas_{antígeno\_e}/ \\ & V_{LEndo} - (mAb_{le}*kon*\text{Antígeno}_{le}) + (R*kon*KD* cplx_{le}) - (1-f1) \\ & *k_{sangre\_endo}*\text{Antígeno}_{le}/ V_{LEndo} \end{aligned}$$

5 Los parámetros usados en el modelo se describen a continuación en la tabla 8.

Tabla 8.

VNorm	5,6 l	Volumen de sangre
VEndo	0,06 l	Volumen de endosomas tempranos
VLEndo	0,06 l	Volumen de endosomas tardíos
k _{dist}	0,48/días	Velocidad de transporte en sangre
kon	0,0001/nM/s	Velocidad de asociación mAb-antígeno
k _{sangre_endo}	11,5 l/día	Velocidad de internalización endosómica
f1	0,7	Fracción que se recicla de endosomas tempranos
f2	0,95	Fracción de mAb que se recicla de endosomas tardíos
K _D	variable	Afinidad de unión [nM]
R	variable	Razón de afinidad a pH endosómico frente a pH neutro
semivida _{antígeno}	variable	Semivida de antígeno en sangre [días]
nivel _{antígeno}	variable	Nivel de antígeno en la sangre [nM]

Los mapas de calor mostrados en la figura 4 muestran cuánto más podría repercutir un anticuerpo con unión dependiente de pH en la inactivación de antígeno sobre la inactivación por un anticuerpo sin unión dependiente de pH. Esta cantidad de inactivación se determina midiendo el área entre las curvas de antígeno de los dos anticuerpos sobre la simulación de 100 días. Se puede considerar cuántos días más podría repercutir un anticuerpo con unión dependiente de pH en la inactivación de antígeno sobre la inactivación por un anticuerpo sin unión dependiente de pH, aunque estos dos sistemas de medida

no tienen que correlacionarse exactamente. Las áreas más claras sobre el mapa reflejan una duración más larga y/o una inactivación más fuerte del antígeno libre. El mapa de calor para la figura 11 muestra cómo podrían repercutir los anticuerpos potenciales con unión a antígenos dependiente de pH
5 sobre antígenos inactivados si el antígeno era DKK1, IgE o C5. Para cada uno de estos antígenos, un anticuerpo con unión dependiente de pH podría prolongar la inactivación de antígeno.

La figura 12 muestra un modelado más detallado para un anticuerpo con unión a dependiente de pH a IgE. Se produce una duración prolongada de la
10 inactivación de IgE del anticuerpo tiene una K_D de aproximadamente 1 nM o mayor y una razón de K_D a pH 6,0/pH 7,4 (R) de 3 o más.

Un análisis similar para el antígeno de DKK1 se muestra en la figura 13 y para C5 en la figura 14. Para DKK1, un intervalo ideal de K_D es de 1,0-100 nM para el intervalo de la razón K_D de 3-30. Para C5, el intervalo ideal de K_D también es
15 de 1,0-100 nM para el intervalo de la razón K_D de 3-30.

Ejemplo 5: Generación y rastreo de anticuerpos anti-IgE con unión IgE dependiente de pH

Se hicieron sustituciones de histidina en las posiciones de los residuos
20 subrayados en el anticuerpo anti-IgE 5.948-H100Y, que tiene las siguientes secuencias de aminoácidos de cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) (las CDR están en fuente negrita).

VL

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHRNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLI
YLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPATF
GGGTKVEIK (SEC ID N.º: 25)

VH

- 5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGW
MDPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGYY
DSDGYSFSGMDVWGQGTTVTVSS (SEC ID N.º: 26)

Se sometieron a prueba los anticuerpos para determinar la unión a IgE a
10 25°C. Para la determinación de afinidades y de constantes cinéticas, se
realizaron todos los experimentos en un biosensor Biacore T200.

Se preparó una superficie de captura de biotina mediante inmovilización
de NeutrAvidin: se activaron todas las células de flujo de un chip sensor de
CM4 Biacore con una mezcla 1:1 (v/v) mezcla de EDC 400 mM y NHS 100 mM
15 durante 7 minutos, a un caudal de 10 µl/minuto. NeutrAvidin (Pierce, n.º de
producto: 31000) se diluyó a 100 µg/ml en acetato de sodio 10 mM pH 4,5 y se
inyectó sobre todas las células de flujo durante 7 minutos a 20 µl/minuto. Se
bloquearon todas las células de flujo con etilendiamina 100 mM en tampón
borato 150 mM pH 8,5 durante 7 minutos a 10 µl/minuto.

20 El constructo de IgE (IgE-Fc (Ch2-Ch3-Ch4) humana, expresado y
purificado en el laboratorio) se biotiniló mínimamente incubando IgE con una
cantidad equimolar de EZ-Link NHS-CL-CL-biotina (Thermo Scientific, n.º de
catálogo 21343) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró la
biotina por medio de intercambio de tampón.

- Todos los experimentos con Biacore se realizaron usando dos de las cuatro células de flujo (1 y 2 ó 3 y 4) del chip sensor en paralelo. Se usó la célula de flujo en dirección 3' como célula de flujo de análisis mientras que se usó la otra célula de flujo como superficie de referencia. Así, se capturó la IgE biotinilada (B-IgE) sobre la célula de flujo de análisis y se inyectó cada fragmento Fab purificado sobre ambas. El sensograma de la célula de flujo de referencia se restó del de la célula de flujo de análisis.
- Se diluyó B-IgE en el tampón de desplazamiento hasta una concentración final de 5 µg/ml inmediatamente antes de la captura. A pH 6,0, se inyectó B-IgE a 10 ul/min durante 60 segundos. A pH 7,4, se inyectó B-IgE durante 80 segundos para obtener niveles de captura similares.
- Se hizo funcionar el ensayo cinético usando una metodología de valoración cinética tal como se describe en Karlsson y col., Anal Biochem 349 : 136-147, 2006.
- Después de la captura de B-IgE, se inyectó un fragmento Fab purificado a 30 µl/min en células de flujo de análisis y de referencia en una serie de inyecciones de concentración baja a alta. La concentración superior de Fab varió desde 30 nM hasta 200 nM y el factor de dilución era de 3 veces. Se inyectó cada dilución de Fab durante 2 minutos, seguido por un tiempo de disociación final de 30 minutos después de la última inyección. Se realizó un grupo de similar de inyecciones tampón de desplazamiento en lugar de Fab para propósitos de referenciación doble (referenciación doble tal como se describe en Myszkowski, J Mol Recognit 12 : 279-284, 1999). Se ajustaron globalmente los sensogramas de referenciación doble a un Langmuir 1:1 simple con un modelo de unión de transporte de masa.

Se realizaron los experimentos a pH 6,0 y 7,4 usando muestra y tampones de desplazamiento de fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, Tween-20 al 0,05%, 1 mg/ml de BSA, pH 6 y fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, Tween-20 al 0,05%, 1 mg/ml de BSA, pH 7,4, respectivamente.

5 Tal como se muestra en la tabla 9 más adelante, la sustitución de histidina en el anticuerpo de IgE 5.948-H100Y dio como resultado exitosamente anticuerpos con una k_D más rápida a pH 6,0 y razones de K_D y k_D más altas a pH 6,0/pH 7,4.

10 Tabla 9. Efecto de la sustitución de histidina sobre la unión a antígeno por anticuerpos de IgE

		pH 6,0				pH 7,4				
	$k_a(M^{-1}S^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$k_d(min)$	$K_D(M)$	$k_a(M^{-1}S^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$k_d(min)$	$K_D(M)$	$k_d-pH6/k_d-pH7,4$	razón de K_D pH 6,0/pH 7,4
H100Y	1,02E+06	1,52E-04	76,00	1,49E-10	1,03E+06	5,01E-05	230,5879	4,87E-11	3,03	3,1
L38H312H100Y	3,29E+05	1,22E-02	0,95	3,71E-08	2,02E+05	1,08E-03	10,69672	5,33E-09	11,30	7,0
H25H100Y	2,98E+05	1,51E-03	7,65	5,08E-09	3,11E+05	1,97E-04	58,64189	6,34E-10	7,66	8,0
H17H25H100Y	2,23E+05	3,64E-03	3,17	1,63E-08	2,22E+05	4,22E-04	27,37548	1,90E-09	8,63	8,6

Las revelaciones de todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan mediante referencia en el presente documento.

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES:

- 5 1. Un anticuerpo con unión dependiente de pH que se une específicamente a un antígeno con una afinidad más alta a pH 7,4 que a pH 6,0, en el que la proporción de K_D y/o la proporción de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 y a 25°C es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, o más, y en el que el anticuerpo tiene eliminación en plasma in vivo reducida cuando se expone a dicho antígeno
- 10 comparado con un anticuerpo sin unión dependiente de pH que tiene una afinidad similar por el antígeno a pH 7,4, pero tiene una proporción de K_D y/o de k_{off} comparable a pH 6,0/pH 7,4 que es menos de 2.
- 15 2. Un anticuerpo con unión dependiente de pH que une específicamente un antígeno con una afinidad más alta a pH 7,4 que a pH 6,0, en el que la proporción de K_D y/o la proporción de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 y a 25°C es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, o más, y en el que el antígeno está tanto unido a membrana como soluble in vivo y en el que el anticuerpo media localización incrementada a un receptor de membrana celular según se compara con un
- 20 anticuerpo que tiene una afinidad similar por el antígeno a pH 7,4 pero que tiene una proporción comparable de K_D y/o de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 que es menos de 2.
- 25 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, en el que el antígeno no es el receptor de interleucina-6.

4. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que el antígeno es un receptor soluble que es un señuelo no señalizador.
- 5 5. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo con unión dependiente de pH es un conjugado de fármaco de anticuerpo, media citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).
- 10 6. Un anticuerpo con unión dependiente de pH que se une específicamente a un antígeno con una afinidad más alta a pH 7,4 que a pH 6,0, en el que la proporción de K_D y/o la proporción de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 y a 25°C es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, o más, y en el que el decrecimiento en la cantidad in vivo de antígeno no unido a anticuerpo se prolonga cuando se
- 15 expone a dicho anticuerpo en comparación con un anticuerpo sin unión dependiente de pH que tiene una afinidad similar por el antígeno a pH 7,4, pero tiene una proporción comparable de K_D y/o de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 que es menos de 2.
- 20 7. Un anticuerpo con unión dependiente de pH que se une específicamente a un antígeno con una afinidad más alta a pH 7,4 que a pH 6,0, en el que la proporción de K_D y/o la proporción de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 y a 25°C es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, o más, y en el que hay un decrecimiento en la cantidad in vivo de antígeno unido a anticuerpo comparado con un anticuerpo
- 25 sin unión dependiente de pH que tiene una afinidad similar por el antígeno a pH

7,4, pero tiene una proporción de K_D y/o de k_{off} comparable a pH 6,0/pH 7,4 que es menos de 2.

8. Un anticuerpo agonista con unión dependiente de pH que se une específicamente a un antígeno con una afinidad más alta a pH 7,4 que a pH 6,0, en el que la proporción de K_D y/o la proporción de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 y a 25°C es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, o más, y en el que el antígeno es un receptor y el receptor tiene eliminación reducida in vivo cuando se expone a dicho anticuerpo en comparación con un anticuerpo que tiene afinidad similar por el receptor a pH 7,4, pero tiene una proporción comparable de K_D y/o de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 que es menos de 2.

9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la proporción de K_D o la proporción de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 es más de, o varía entre, 20, 30, 40 ó 100 o más.

10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la unión del anticuerpo al antígeno a pH 7,4 tiene una K_D de aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 100 nM.

11. El anticuerpo de la reivindicación 10, en el que la unión del anticuerpo al antígeno a pH 7,4 tiene una K_D de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 10 nM.

12. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la unión del anticuerpo al antígeno a pH 7,4 tiene una k_{off} de aproximadamente $1 \times 10E-$

4 s-1 a aproximadamente 1×10^{-1} s-1.

13. El anticuerpo de la reivindicación 12, en el que la unión del anticuerpo al antígeno a pH 7,4 tiene una k_{off} de aproximadamente 1×10^{-3} s-1 a
5 aproximadamente 1×10^{-1} s-1.

14. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el antígeno es PCSK9.

15. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que el antígeno es IgE, C5, o
10 DKK1 y la KD varía entre 1,0 nM a aproximadamente 10 nM o entre 1,0 nM a aproximadamente 100 nM.

16. Un procedimiento de prolongar dosificación en intervalo y/o disminuir la dosis terapéutica para tratar un paciente con un anticuerpo terapéutico,
15 comprendiendo dicho procedimiento administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en las que dicho anticuerpo tiene un efecto farmacodinámico prolongado y/o una semivida prolongada comparado con un anticuerpo que tiene afinidad similar a pH 7,4, pero que tiene una proporción de K_D y/o una proporción de k_{off}
20 a pH 6,0/7,4 y a 25°C que es menos de 2.

17. Un procedimiento de fabricar un anticuerpo con semivida prolongada y/o efecto farmacodinámico prolongado por regulación de afinidad de unión de anticuerpos en una manera dependiente de pH, comprendiendo dicho
25 procedimiento seleccionar residuos de histidina de CDR de anticuerpos u otros

residuos que optimizan el microambiente que afecta a pKa, de tal forma que la unión de antígeno a anticuerpo tiene una proporción de K_D y/o una proporción de k_{off} a pH 6,0/pH 7,4 que es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, o más.

5 18. Una biblioteca de anticuerpos enriquecida por histidinas en residuos de CDR u otros residuos que optimizan el microambiente que afecta a pKa.

19. El procedimiento de la reivindicación 17, que comprende adicionalmente mutagenizar el anticuerpo para lograr afinidad a anticuerpo con una K_D a pH
10 7,4 de al menos 100 nM.

20. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a PCSK9 y comprende una región variable de cadena pesada (VH) una región determinante de la complementariedad (CDR1), una CDR2 de VH y una CDR3 de VH de la
15 secuencia de aminoácidos de VH mostrada en SEC ID N.º: 4 ó 5 o una variante de las mismas que tiene una, dos, tres o más sustituciones conservadoras de aminoácidos en CDR1, CDR2, y/o CDR3.

21. El anticuerpo aislado de la reivindicación 20, que comprende
20 adicionalmente CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera (VL) de la secuencia de aminoácidos de VL mostrada en la SEC ID N.º: 3 o una variante de la misma que tiene una, dos, tres o más sustituciones de aminoácidos conservadoras en CDR1, CDR2, y/o CDR3.

25 22. El anticuerpo aislado de la reivindicación 21, en el que la CDR1 de VH

- tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 6, la CDR2 de VH tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 7, la CDR3 de VH tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 8 ó 9, la CDR1 de VL tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 10,
- 5 la CDR2 de VL tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º: 11, y la CDR3 de VL tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º: 12 o una variante del mismo que tiene una, dos, tres o más sustituciones de aminoácidos conservadoras en CDR1, CDR2, y/o CDR3.
- 10 23. El anticuerpo aislado de la reivindicación 22, en el que el CDR3 de VH tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9 o una variante de la misma que tiene una, dos, tres o más sustituciones conservadoras de aminoácidos en CDR1, CDR2, y/o CDR3.
- 15 24. El anticuerpo aislado de la reivindicación 23, en el que el la región de VH comprende SEC ID N.º: 4 o SEC ID N.º: 5 y la región VL comprende SEQ ID N.º: 3.
- 20 25. El anticuerpo aislado de la reivindicación 24, en el que la región VH comprende SEC ID N.º: 5.
26. Un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene N.º de Acceso de ATCC PTA-10547, o PTA-10548, y/o PTA-10549.

27. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-26.

5 28. Una célula huésped que produce recombinantemente el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-26.

29. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-26.

10

30. Un plásmido aislado según se deposita en la ATCC y que tiene N.º de Acceso de ATCC PTA-10547, o PTA-10548, y/o PTA-10549.

15 31. Un procedimiento para reducir un nivel de LDL-colesterol en sangre de un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de las reivindicaciones 1-26.

Resumen

La presente invención se refiere a anticuerpos con unión dependiente de pH a su antígeno de tal forma que la afinidad de unión al antígeno a pH fisiológico (es decir, pH 7,4) es mayor que a pH endosómico (es decir, pH 6,0 o 5,5). En otras palabras, la proporción de K_D o la proporción de k_{off} a pH 5,5/pH 7,4 o a pH 6,0/pH 7,4 es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, 20, 30, 40, o 100 o más. Tales anticuerpos dependientes de pH se disocian preferencialmente del antígeno en el endosoma. Esto puede incrementar la semivida del anticuerpo, en comparación con los anticuerpos con K_D equivalentes a pH 7,4 pero con ninguna unión dependiente de pH, cuando el antígeno es uno que sufre la eliminación mediada por antígeno (por ejemplo, PCSK9). Los anticuerpos con unión dependiente de pH pueden disminuir la semivida de antígeno total cuando el antígeno sufre eliminación reducida cuando se une a anticuerpo (por ejemplo, IL6). Los anticuerpos con unión dependiente de pH también pueden prolongar el decrecimiento en antígeno que no está unido a anticuerpo. Esto puede ser importante cuando se antagoniza un antígeno objetivo típicamente presente a niveles altos (por ejemplo, IgE, DKK1, C5 y SOST). Además, tales anticuerpos pueden incrementar la semivida de antígeno cuando el antígeno es un receptor y el receptor tiene eliminación incrementada cuando se une a anticuerpo (por ejemplo, receptor de GMCSF).

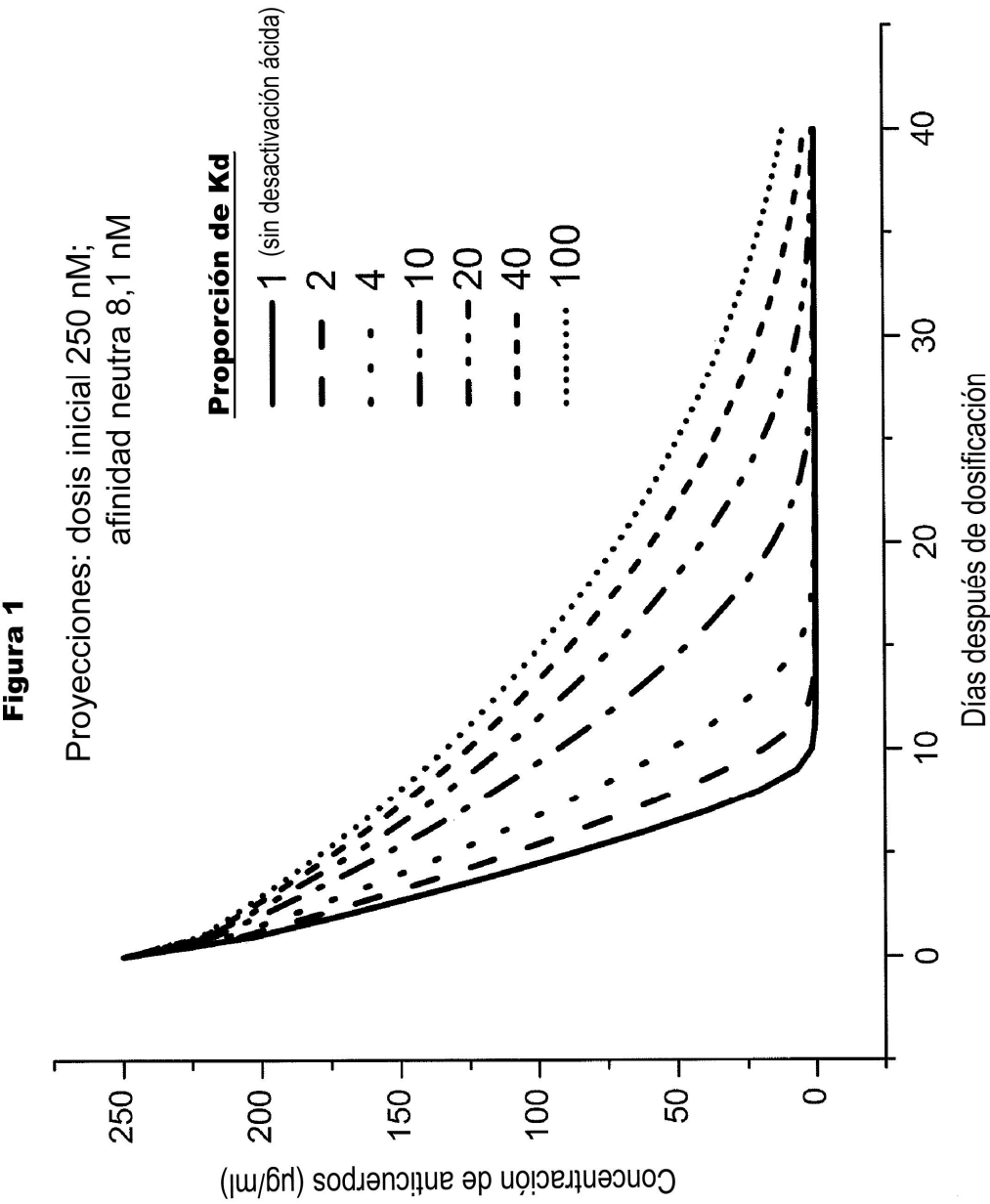
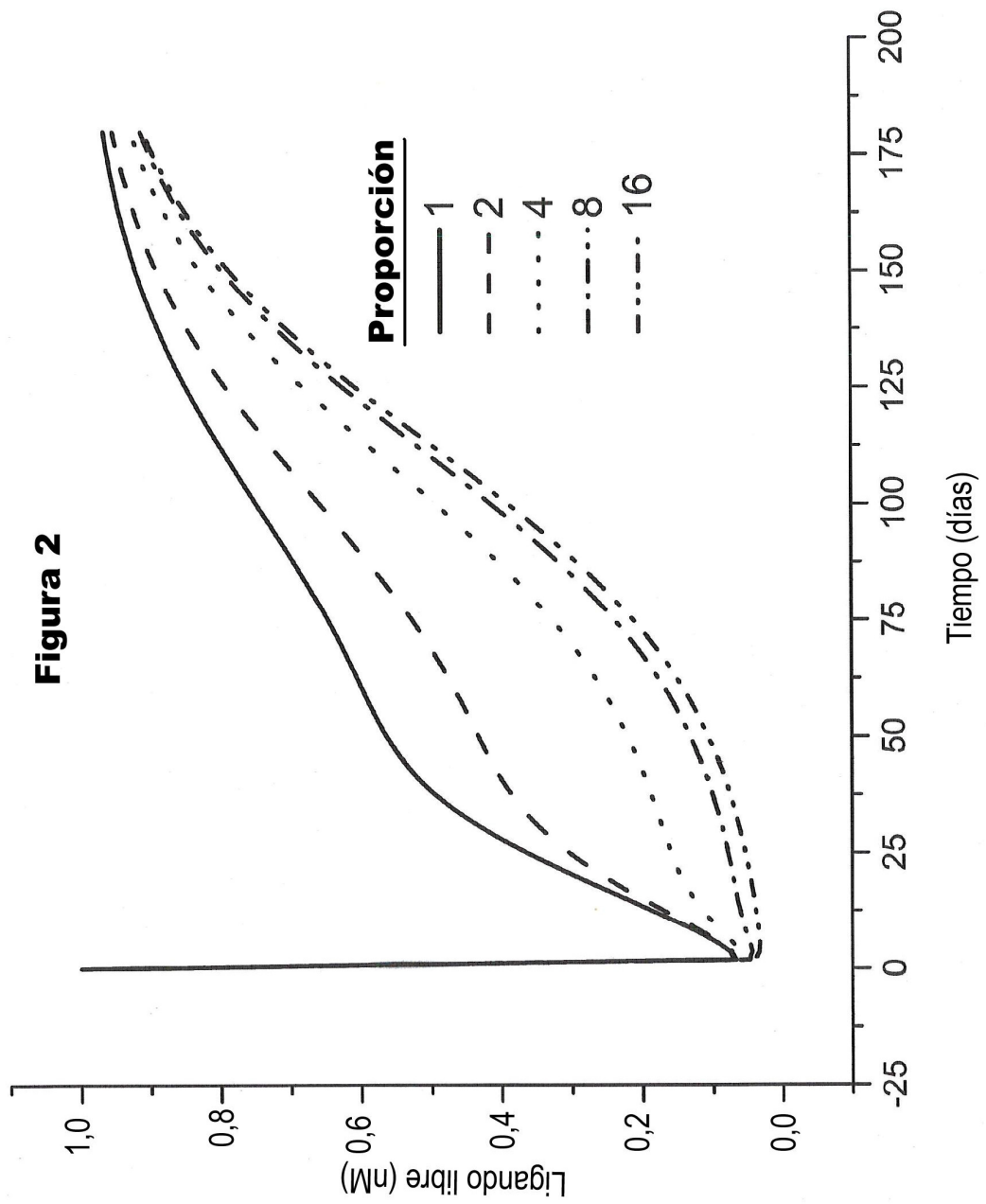
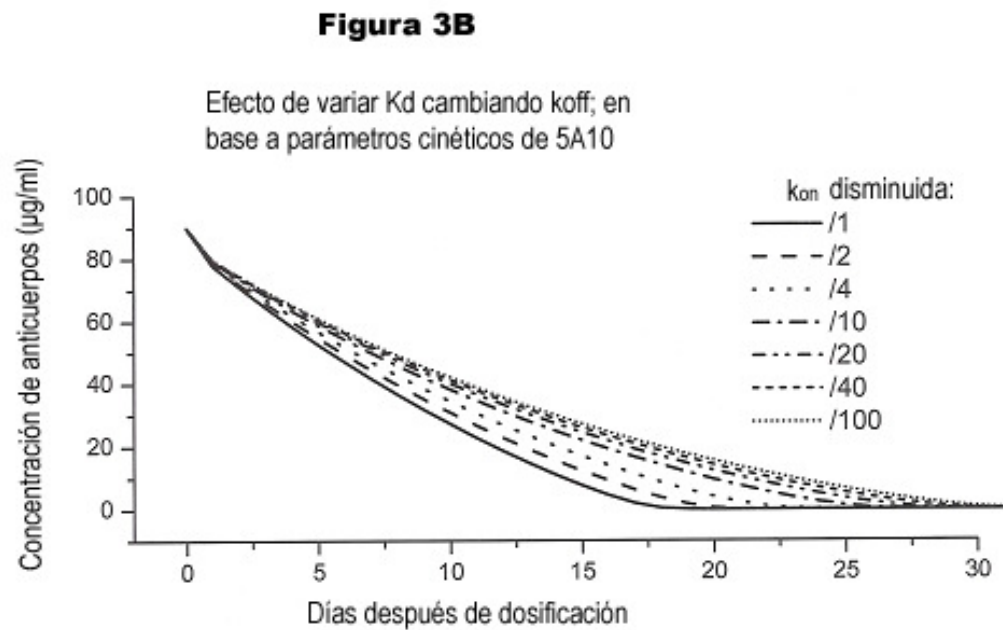
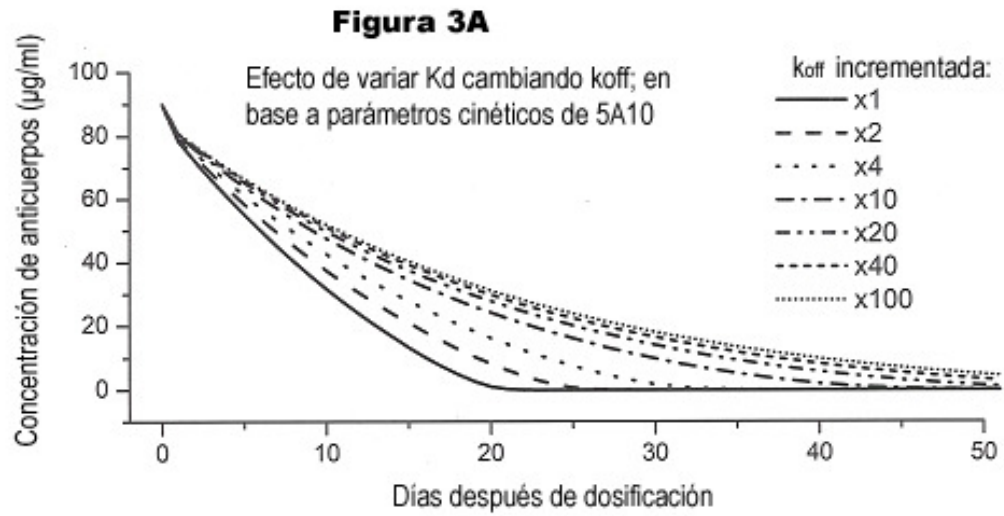


Figura 2





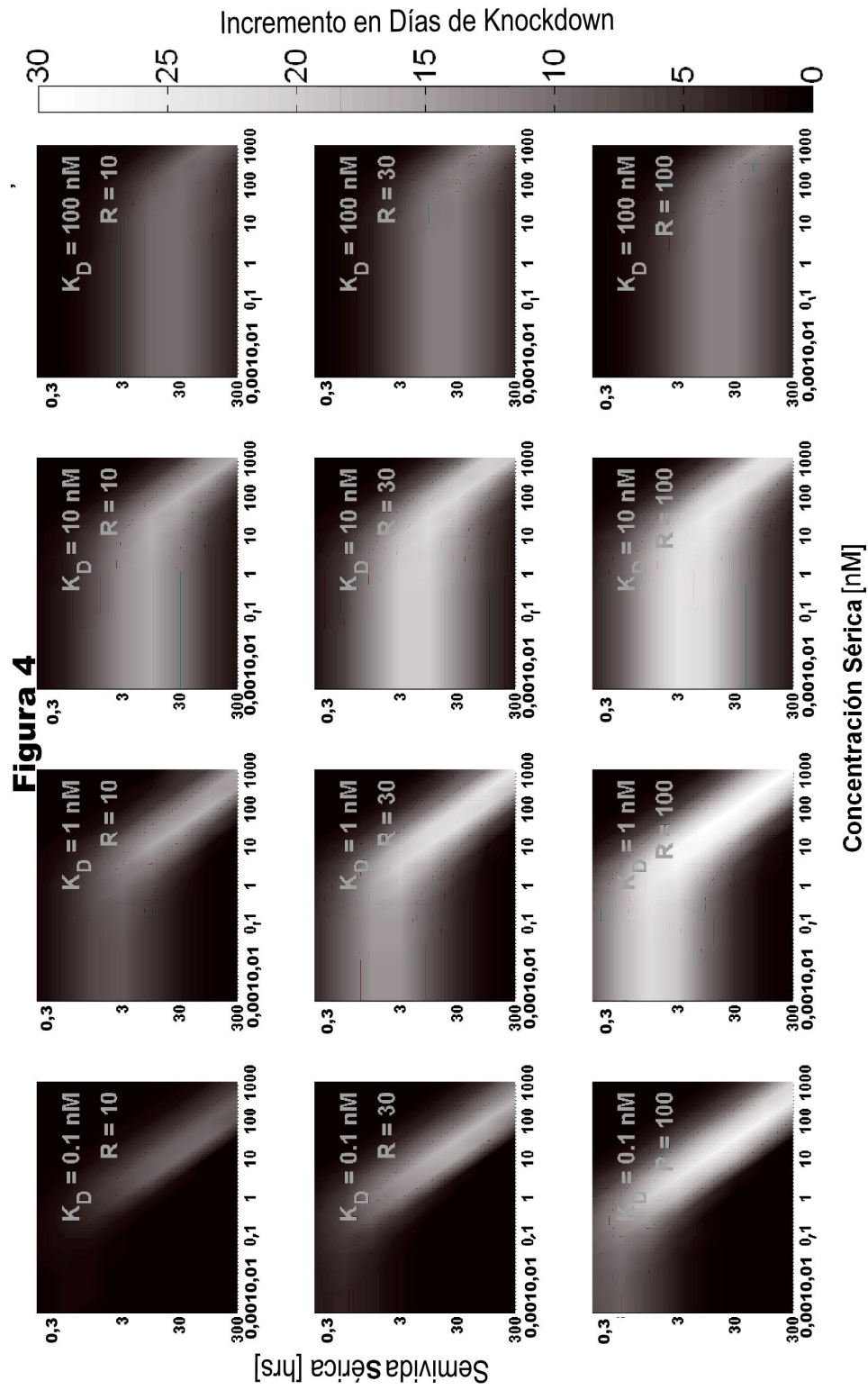


Figura 5A

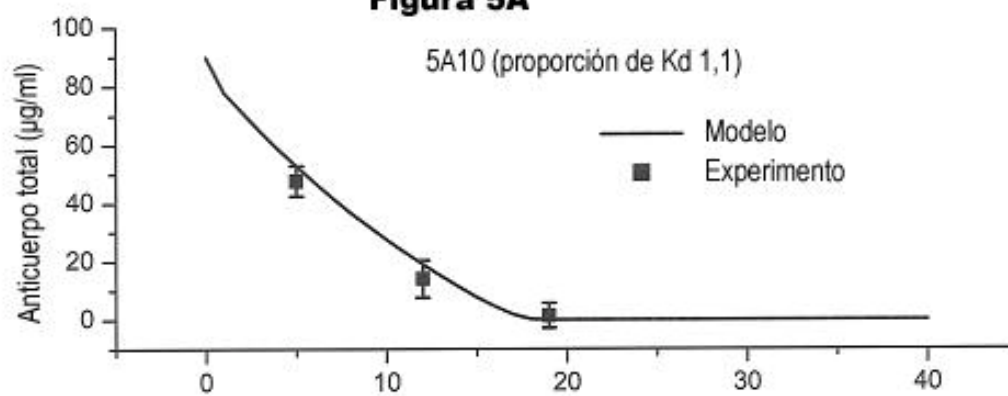


Figura 5B

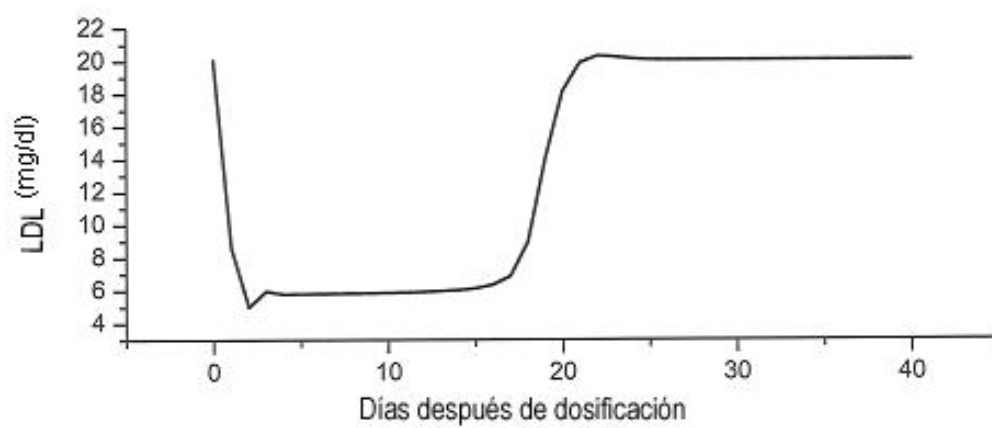


Figura 6A

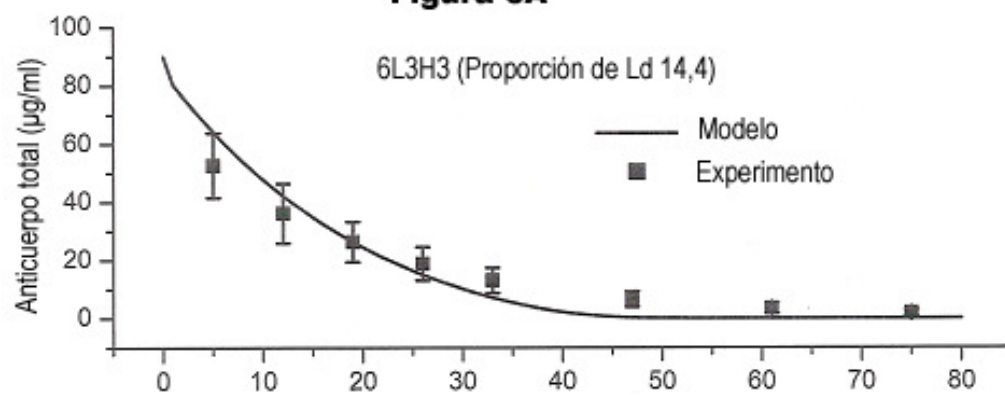


Figura 6B

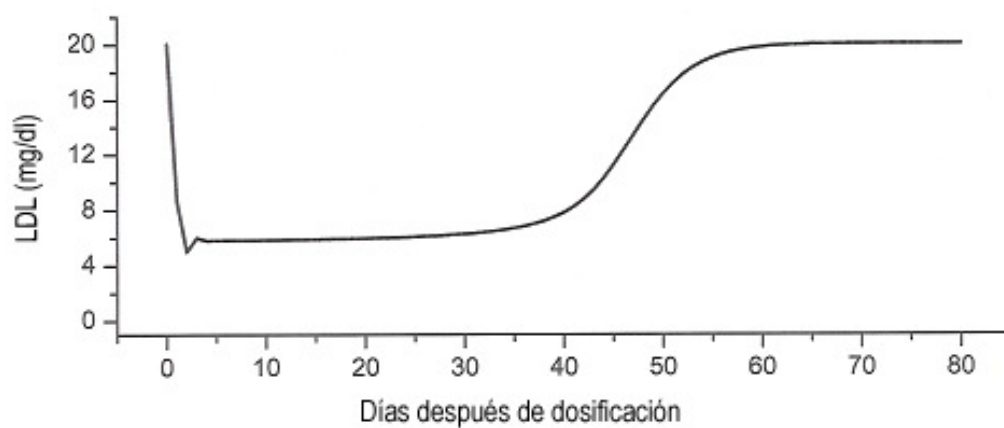


Figura 7A

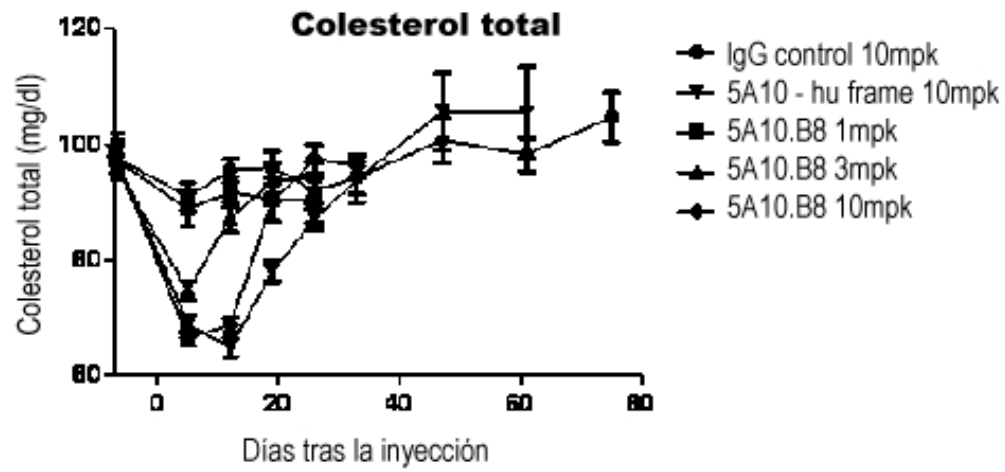
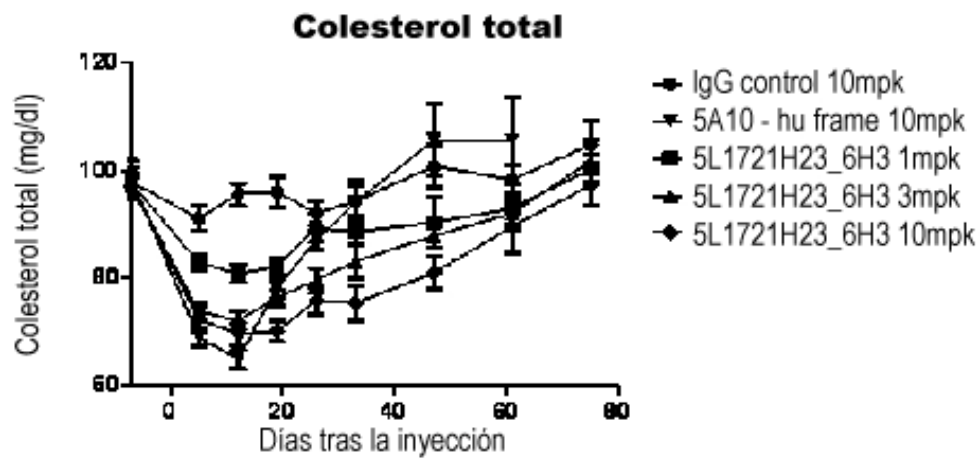
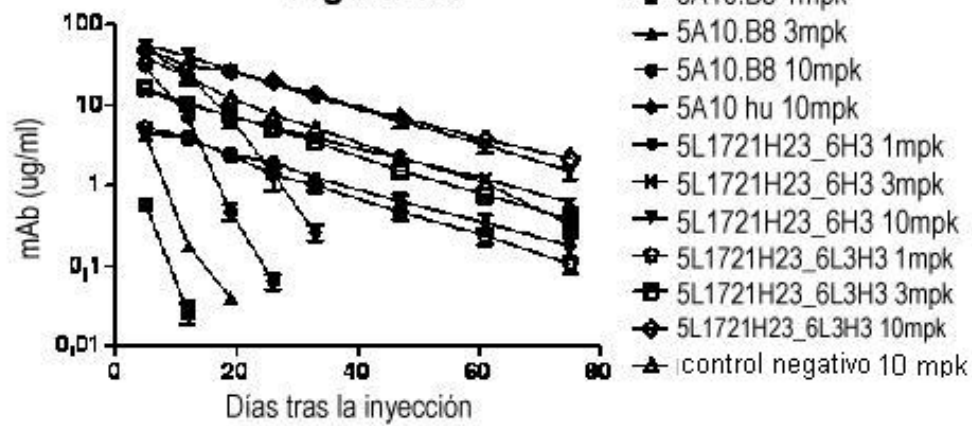


Figura 7B



control negativo 10 mpk

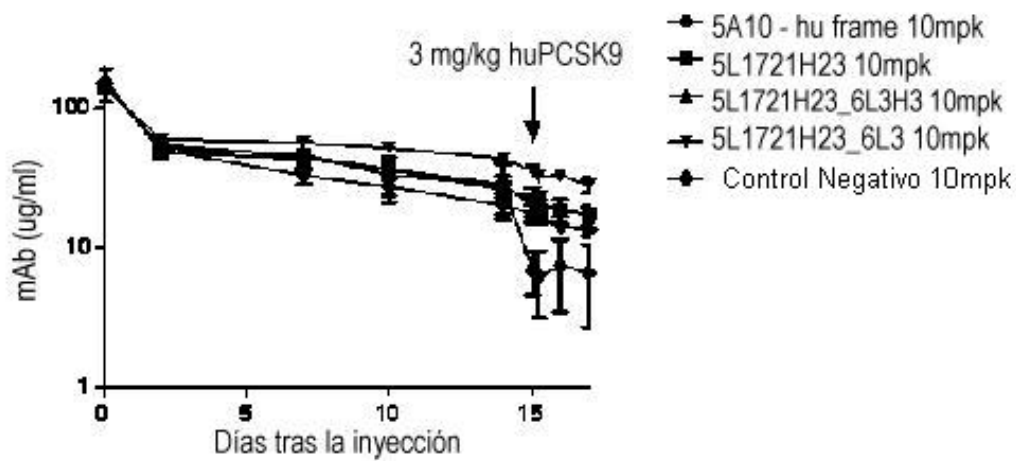
Figura 8A

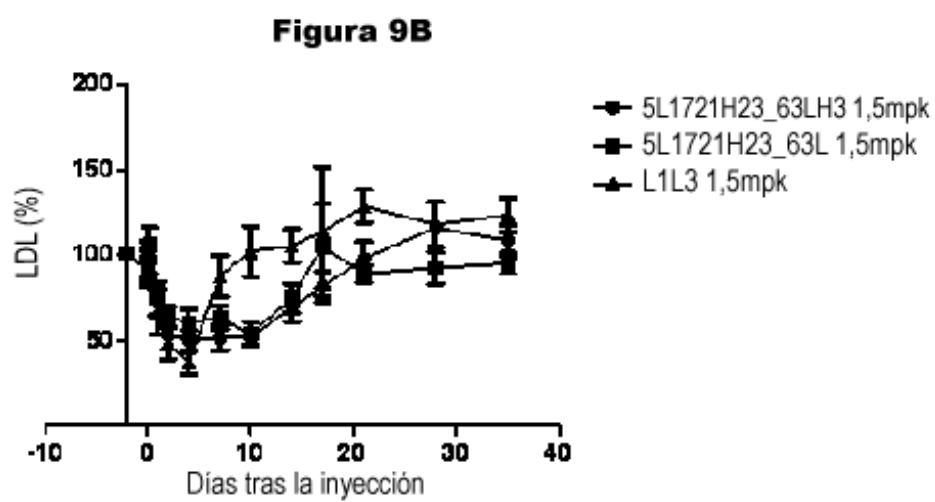
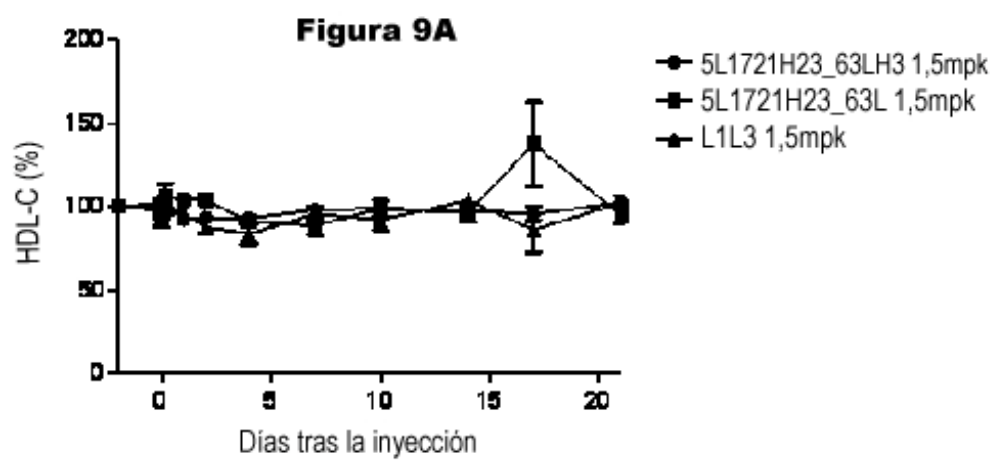


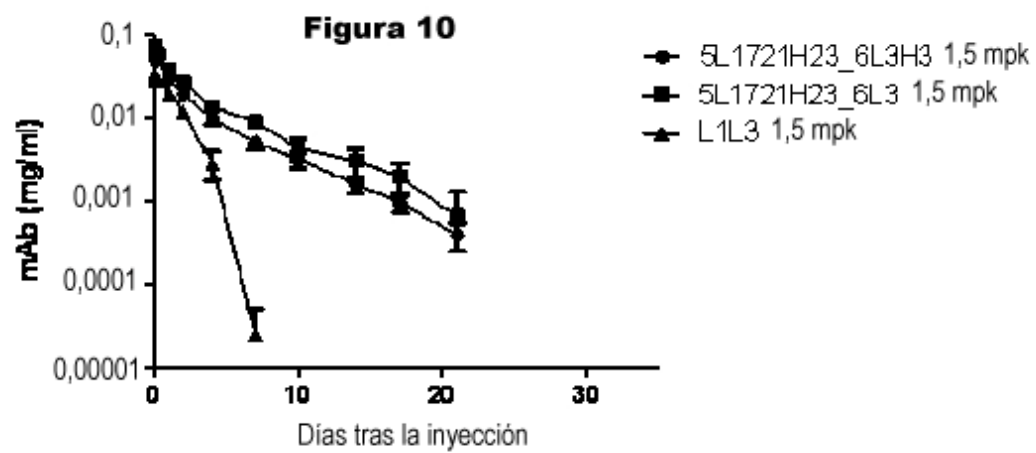
*se eliminó un valor anormal del grupo 5A10

** las concentraciones de mAb por debajo del límite de detección se reemplazan con el valor límite de detección

Figura 8B







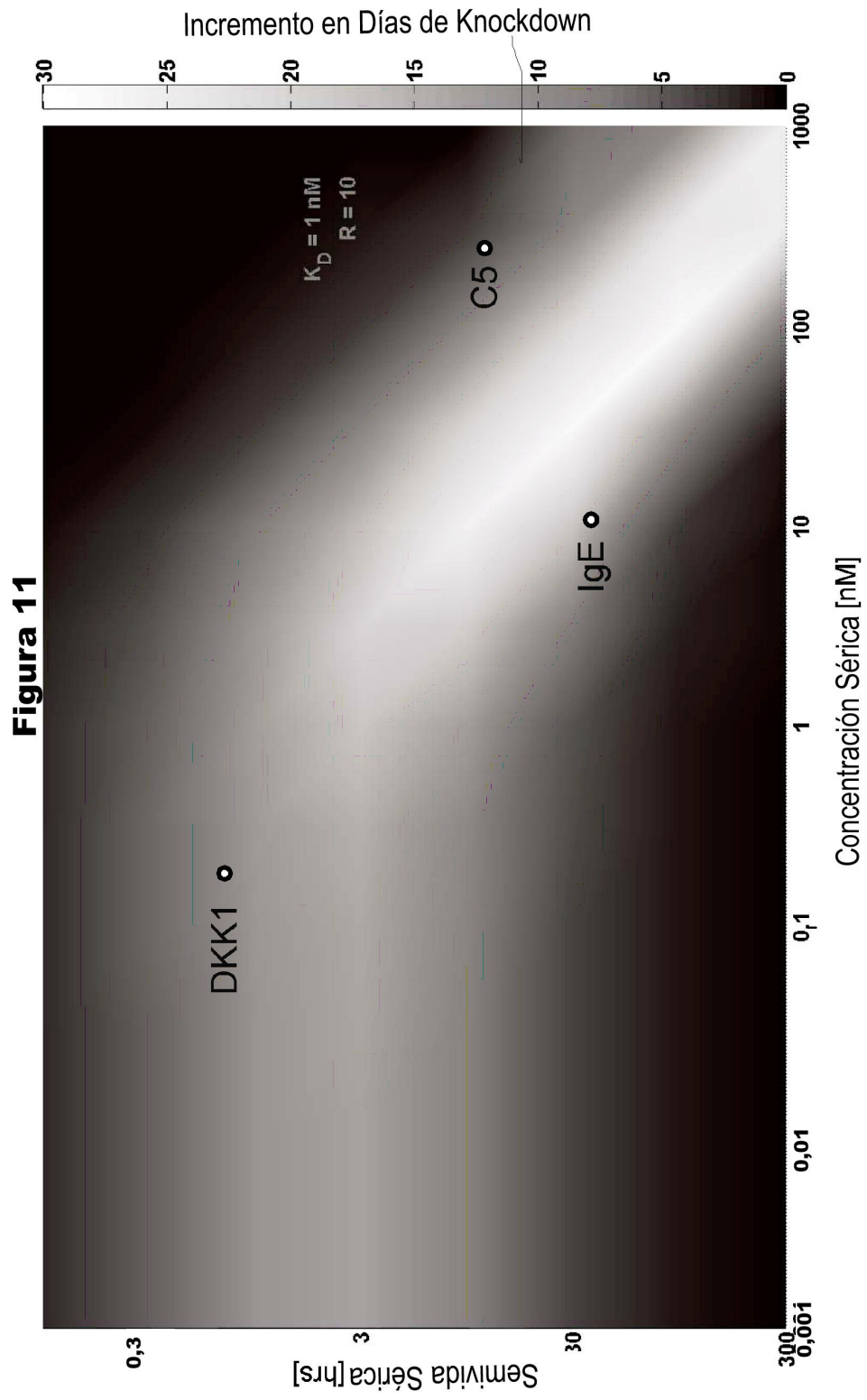
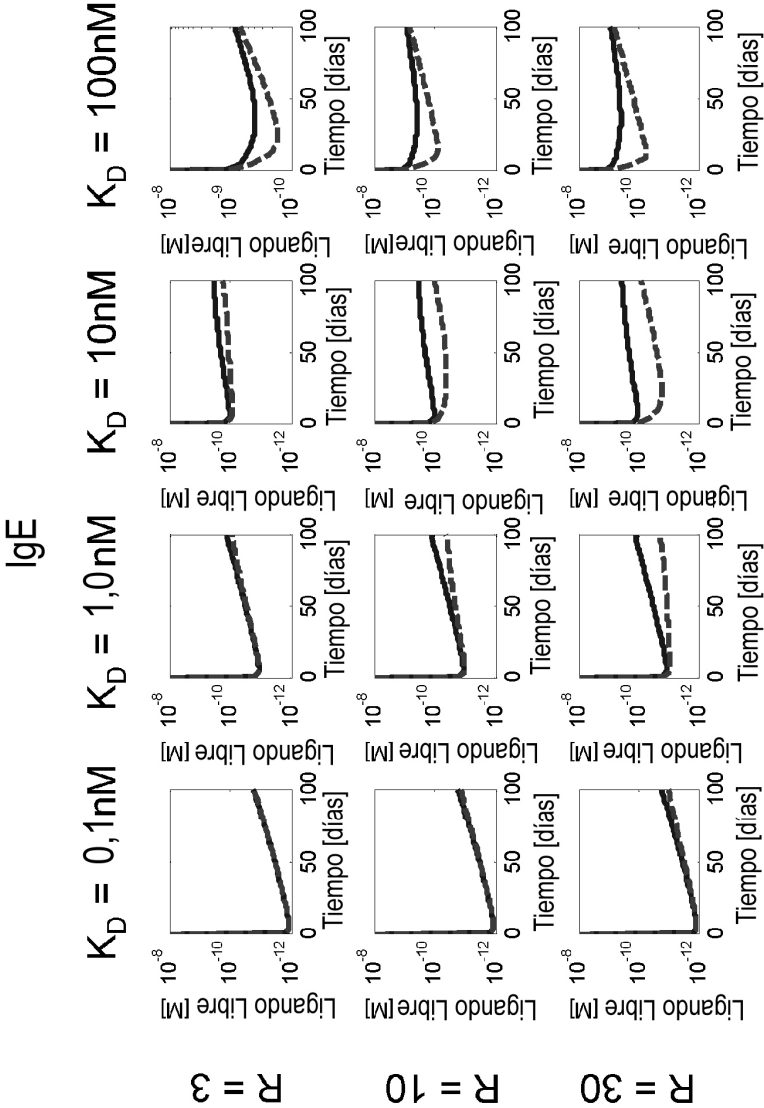


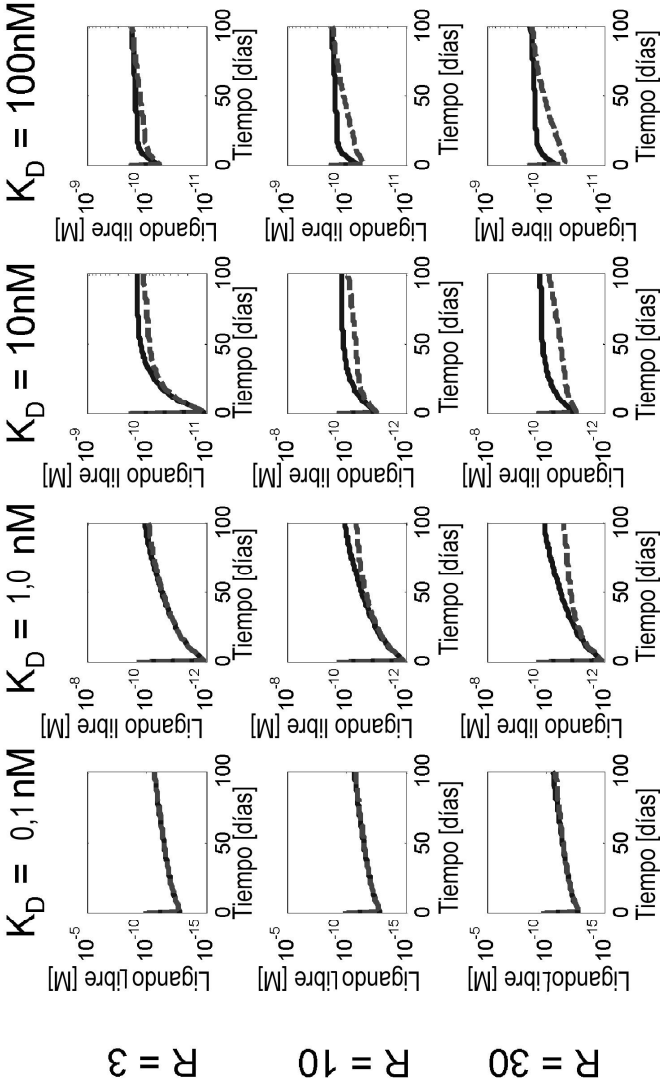
Figura 12



Línea Sólida, Anticuerpo Normal($R = 1$)
Línea Discontinua, Anticuerpo Desactivado por Ácido (R depende de col.)
 $R = (k_{off} @ pH 6)/(k_{off} @ pH 7.4)$

Figura 13

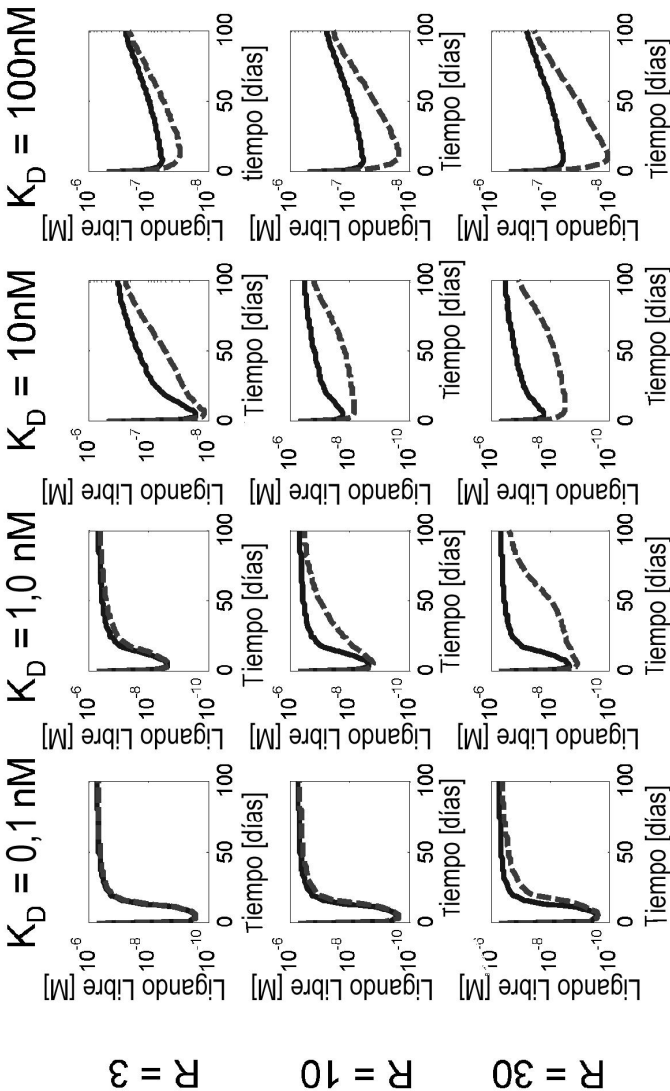
DKK-1



Línea Sólida, Anticuerpo Normal ($R = 1$)
Línea Discontinua, Anticuerpo Desactivado por Ácido (R depende de col.)
 $R = (k_{\text{off}} @ \text{pH } 6) / (k_{\text{off}} @ \text{pH } 7.4)$

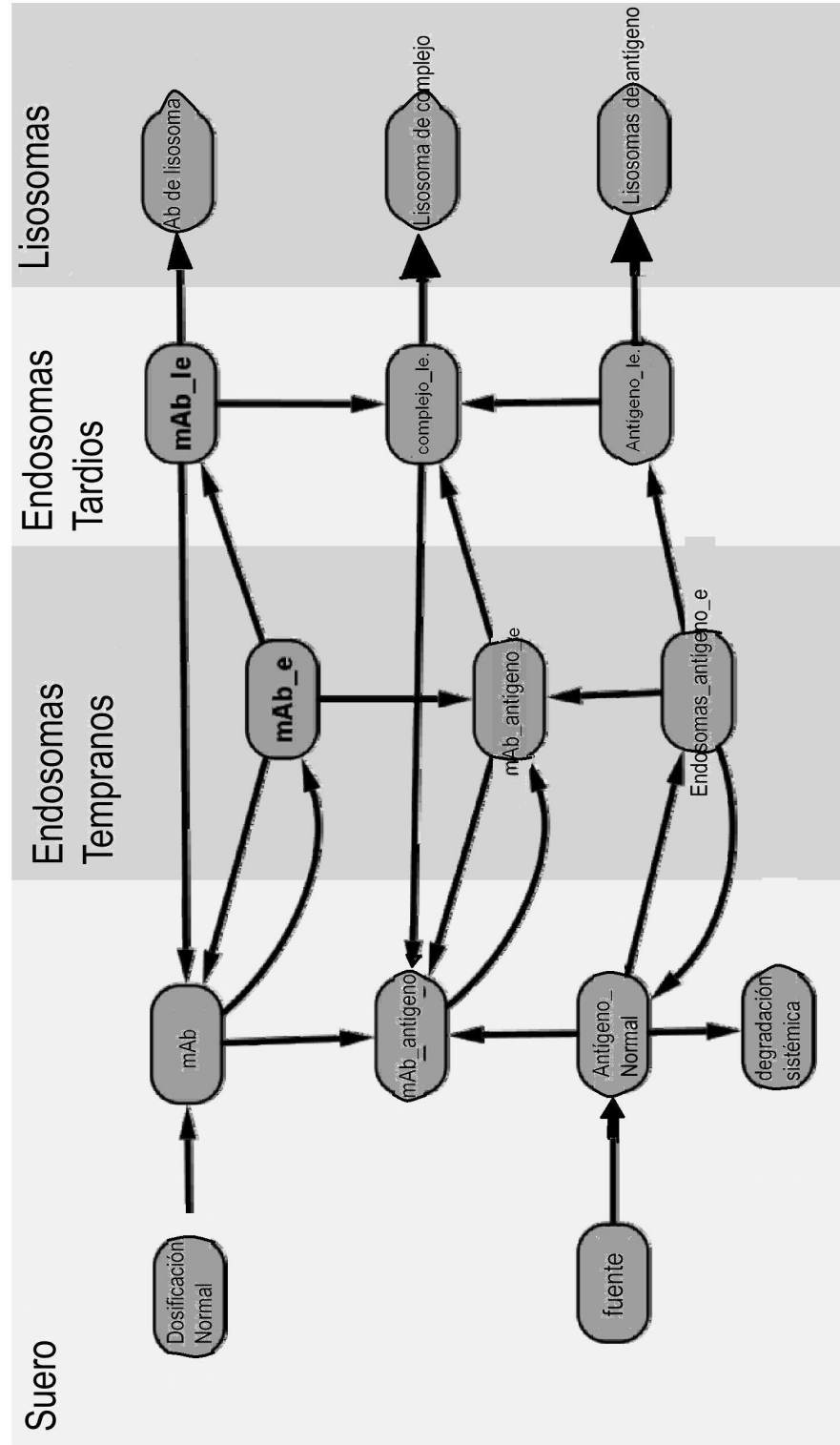
Figura 14

C5



Línea Sólida, Anticuerpo normal ($R = 1$)
Línea Discontinua, Anticuerpo Desactivado por Ácido (R depende de col.)
$$R = (k_{\text{off}} @ \text{pH } 6) / (k_{\text{off}} @ \text{pH } 7.4)$$

Figura 15
Diagrama Modelo



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> RINAT NEUROSCIENCE CORP.
PFIZER INC.

<120> ANTICUERPOS CON UNIÓN A ANTÍGENO DEPENDIENTE DEL pH

<130> PC33956A

<150> US 61/313,102

<151> 2010-03-11

<150> US 61/447,638

<151> 2011-02-28

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 3

- 154 -

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 4

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

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

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

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

- 155 -

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapien

<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 Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 6

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

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 7

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

Ser

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 8

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 9

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Leu
1 5

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 10

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

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 11

His Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 12

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Trp Arg Thr
1 5

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 13

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

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 14

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

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 15

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

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 16

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

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 17

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 18

Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr
1 5

<210> 19
<211> 17

<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 19

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

Ser

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 20

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

Ser

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 21

Glu	Arg	Pro	Leu	His	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5				

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 22

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

<210> 23

<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 23
gatatccaga tgacacagtc cccatcctcc ctgtctgcct ctgtgggcga ccgcgtcacc
60

atcacctgca aggcctctca ggatgtgcat actgctgtag cctggatatca gcagaagcca
120

ggcaaagccc caaaactgct gatctacat gcacccctacc gctacactgg tgtcccatca
180

cgcttcagtg gcagtggctc tggtagagat ttcaccttca ccattagcag cctgcaacca
240

gaagatattg ccacttatta ctgccagcaa cgttatagtc tgtggcgcac gttcgggtcaa
300

ggcaccaagc tggagatcaa a
321

<210> 24
<211> 354
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 24
caggtgcagc tggtagcagtc tggtagctgag gtgaagaagc ctggcgcttc cgtgaagggt
60

tcctgcaaag catctgggta cacctttacc agctactata tgcactgggt gcgccaagcc
120

cctgggtcaag gcctggagtg gatgggcgag attcatccta gcggcggtcg tactaactac
180

aatgagaagt tcaagagccg cgtgactatg actcgcgata cctccaccag cactgtctac
240

atggaactga gctctctgcg ctctgaggac actgctgtgt attactgtgc ccgcgagcgc
300

cccctgtatg ctagcgacct gtggggccag ggtaccacgg tcaccgtctc ctca
354

<210> 25
<211> 113

- 161 -

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 25

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

Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Arg
			20					25					30		

Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			

Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				

Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ala
				85					90					95	

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

Lys

<210> 26

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 26

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

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

- 162 -

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asp Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Ser Asp Gly Tyr Tyr Ser Phe Ser Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 27

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

pctib2011050989-seq1
SEQUENCE LISTING

<110> RINAT NEUROSCIENCE CORP.
PFIZER INC.

<120> ANTIBODIES WITH pH DEPENDENT ANTIGEN BINDING

<130> PC33956A

<150> US 61/313,102

<151> 2010-03-11

<150> US 61/447,638

<151> 2011-02-28

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 2

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

pctib2011050989-seq1

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapien
<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

pctib2011050989-seq1

<210> 4
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<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 Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

pctib2011050989-seq1

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 6

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

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 7

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

Ser

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 8

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 9

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Leu
1 5

pctib2011050989-seq1

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 10

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

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 11

His Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 12

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Trp Arg Thr
1 5

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 13

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

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 14

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

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 15

pctib2011050989-seq1

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

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 16

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

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 17

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 18

Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr
1 5

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 19

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

Ser

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 20

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

pctib2011050989-seq1

Ser

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 21

Glu Arg Pro Leu His Ala Met Asp Tyr
 1 5

<210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 22

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

<210> 23
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

<400> 23
 gatatccaga tgacacagtc cccatcctcc ctgtctgcct ctgtgggcga ccgcgtcacc 60
 atcacctgca aggcctctca ggatgtgcat actgctgtag cctgggtatca gcagaagcca 120
 ggcaaagccc caaaactgct gatctaccat gcatcctacc gctacactgg tgtcccatca 180
 cgcttcagtg gcagtggctc tggtagagat ttcaccttca ccattagcag cctgcaacca 240
 gaagatatgt ccacttatta ctgccagcaa cgttatagtc tgtggcgac gttcgggtcaa 300
 ggcaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 24
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

<400> 24
 cagggtgcagc tgggtgcagtc tgggtgctgag gtgaagaagc ctggcgcttc cgtgaagggtt 60
 tcctgcaaag catctgggta cacctttacc agctactata tgcactgggt gcgccaagcc 120
 cctgggtcaag gcctggagtg gatgggcgag attcatccta gcggcggtcg tactaactac 180
 aatgagaagt tcaagagccg cgtgactatg actcgcgata cctccaccag cactgtctac 240
 atggaactga gctctctgcg ctctgaggac actgctgtgt attactgtgc ccgcgagcgc 300
 cccctgtatg ctagcgacct gtggggccag ggtaccacgg tcaccgtctc ctca 354

pctib2011050989-seq1

<210> 25
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 25

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Arg
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

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

Lys

<210> 26
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 26

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Met Asp Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

pctib2011050989-seq1

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asp Ser Asp Gly Tyr Tyr Ser Phe Ser Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 27

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/B2011/050989

International filing date (day/month/year)
09.03.2011

Priority date (day/month/year)
11.03.2010

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/40

Applicant
RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1b/s(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Fellows, Edward

Telephone No. +49 89 2399-7460



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/IB2011/050989

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established 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)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - 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 purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing 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.
5. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>5, 20-26, 28-31</u>
	No: Claims	<u>1-4, 6-19, 27</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-31</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-31</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/IB2011/050989

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

1 **Concerning section V**

Reference is made to the following document:

D1 WO 2009/125825 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP];
IGAWA TOMOYUKI [JP]; ISHII SHINYA [J]) 15 October 2009
(2009-10-15); & EP 2 275 443 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL
CO LTD [JP]) 19 January 2011 (2011-01-19)

1.1 **Novelty and inventive step** (Articles 33(1), 33(2) and 33(3) PCT)

Novelty

Document **WO2009125825 (D1)** is published in Japanese. Document **EP2275443** is considered to be the correct translation of **WO2009125825** and will be referred to herein below for citation purposes.

Document **D1** discloses methods for the production of engineered antigen binding polypeptides, such as IgG antibodies directed against any antigen, e.g. cytokines receptors such as IL-31R (cf. page 20, paragraphs 136-137), which bind antigens multiple times, and methods for improving the half-lives of such molecules in plasma (cf. fig. 2, page 244) as well as pharmaceutical compositions comprising said molecules. **D1** discloses antibodies having a KD (pH5.8)/KD(pH7.4) value, defined as the ratio of KD for the antigen at pH 5.8 and KD for the antigen at pH 7.4, of 2 or higher, e.g. 10 or 40 wherein at least one amino acid of the antibody has been substituted with histidine, or at least one histidine has been inserted into the antibody. Moreover, **D1** also discloses that said antibody has an antagonistic activity and that it binds to membrane bound and soluble antigens (cf. paragraphs 10-12, 52, 62-69, 95 and all tables and examples). Furthermore, **D1** suggests that such antibodies may be obtained from antibody libraries (cf. paragraphs 148-150).

D1 anticipates the subject-matter of **claims 1-4, 6-19 and 27** and therefore said claims cannot be acknowledged as novel (Articles 33(1) and 33(2) PCT).

1.2 None of the prior-art documents mentioned above disclose the subject-matter of **claims 5, 20-26 and 28-30**. Therefore, said claims appear to fulfill the requirements of Articles 33(1) and 33(2) PCT.

Inventive step

- 1.3 **Claims 5, 14, 15, 20-26 and 28-30** appear to lack inventive step for the following reasons:
- 1.4 Document **WO2009125825 (D1)** is the closest prior art for the subject-matter of **claims 14 and 20-26** and is published in Japanese. Document EP2275443 is considered to be the correct translation of **WO2009125825** and will be referred to herein below for citation purposes.
- The subject-matter of **claims 14 and 20-26** differs from that of the content of **D1** by the specific amino acid sequences given for the therapeutic anti-PCSK9 antibody. There is no technical effect caused by this difference. Therefore, in view of the closest prior art, the objective technical problem to be solved can be seen in the provision of an alternative therapeutic antibody. The solution to said objective technical problem, i.e., the subject-matter of **claims 14 and 20-26**, is not considered inventive for the following reasons:
- The production and selection of monoclonal antibodies directed against well known proteins such as PCSK9 or other well known antigens such as DKK1 is considered routine experimentation for the person skilled in the art. Similarly, the production of the chimeric or humanised form of such antibodies is also considered routine experimentation and cannot serve as a basis for inventive step. Additionally, since the antibodies selected in **claims 14, 15 and 20-26** do not appear to solve an unforeseeable technical problem in the art or to lead to a specific technical effect over that already disclosed in **D1** an inventive step cannot be acknowledged contrary to the requirements of Articles 33(1) and 33(3) PCT.
- 1.5 For similar reasons as those exposed in section 1.4, the method of producing the antibody in a host cell of **claim 28** and the DNA encoding said antibody as contained in **claims 29 and 30** respectively, are not considered to encompass an inventive step (Articles 33(1) and 33(3) PCT).
- 1.6 In view of the prior-art documents at hand, **claims 5 and 31** do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT with respect to inventive step since these additional features appear conventional and do not result in any unexpected technical effect (Articles 33(1) and 33(3) PCT).

- 1.7 It is noted that, the antibodies of **claims 20-25** are defined by partial structural elements. The sequences allow for a less than 100% identity. In view of the importance of the role played by each single amino acid in the binding of an antibody to its target, especially at the level of its CDRs, a claim to an antibody which is structurally characterized by less than the full sequence of all the CDRs does not represent the solution to the underlying technical problem and therefore cannot be considered to involve an inventive step (Articles 33(1) and 33(3) PCT).

2 Concerning section VIII

Clarity (Article 6 PCT)

- 2.1 **Claim 4** does not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The functional statement "a non-signaling decoy" does not enable the skilled person to determine which technical features are necessary to perform the stated function.

- 2.2 **Claims 20-25** lack clarity (Article 6 PCT) because a claim related to an antibody should contain all the characteristic features allowing the skilled person to identify which antibody falls within its scope. It is commonly accepted in the field that 6 CDRs in a precise order on two distinct polypeptide chains (i.e. the light and the heavy chains) are required in order for the antibody to bind with the expected affinity to the target epitope. Therefore a claim which defines an antibody with only one or an incomplete combination of CDR lacks clarity because it leaves the reader in doubt as to the exact scope of the intended protection.

3 Further remarks

Inventions relating to antibodies should be considered under the PCT Guidelines part II chapter 4, in particular the applicant should provide a copy of the deposit receipts of the antibodies claimed (cf. PCT Guidelines part II chapter 4, 4.16 and 4.17; Article 5 PCT and Rules 13bis.1 and 13bis.2 PCT).

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPEA (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC33956A	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2011/050989	International filing date (<i>day/month/year</i>) 09/03/2011	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 11/03/2010
Applicant RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 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. 7B
- ☒ 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/IB2011/050989

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c 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/IB2011/050989

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/40

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/125825 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]; IGAWA TOMOYUKI [JP]; ISHII SHINYA []) 15 October 2009 (2009-10-15) page 20, paragraph 136 - paragraph 137; figure 2 paragraphs [0010] - [0012], [0052], [0062] - [0069], [0095]; example all; table all paragraph [0148] - paragraph [0150] & EP 2 275 443 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]) 19 January 2011 (2011-01-19) ----- -/--	1-31



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

2 September 2011

Date of mailing of the international search report

14/09/2011

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

Fellows, Edward

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2011/050989

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SARKAR CASIM A ET AL: "Rational cytokine design for increased lifetime and enhanced potency using pH-activated "histidine switching"", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 20, no. 9, September 2002 (2002-09), pages 908-913, XP000002657852, ISSN: 1087-0156 the whole document -----	1-31
A	MAEDA K ET AL: "pH-dependent receptor/ligand dissociation as a determining factor for intracellular sorting of ligands for epidermal growth factor receptors in rat hepatocytes", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 82, no. 1, 18 July 2002 (2002-07-18), pages 71-82, XP004369791, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/S0168-3659(02)00126-8 the whole document -----	1-31
A	FREDERICK R MAXFIELD & TIMOTHY E MCGRAW: "Endocytic recycling", NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY, NATURE PUBLISHING, GB, vol. 5, no. 2, 1 February 2004 (2004-02-01), pages 121-132, XP009151548, ISSN: 1471-0072 the whole document -----	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2011/050989

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009125825 A1	15-10-2009	AR 071656 A1	07-07-2010
		AU 2009234675 A1	15-10-2009
		CA 2721052 A1	15-10-2009
		CN 102056946 A	11-05-2011
		EC SP100600 A	31-03-2011
		EP 2275443 A1	19-01-2011
		KR 20110004435 A	13-01-2011
		US 2011111406 A1	12-05-2011
