



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Organizacion CSA Ltda

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

NOV 17

PEDIENTE N°

07-78108

TÍTULO

"ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA ANGPTL4"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 16/22 A61K 39/395

71. SOLICITANTE LEXICON PHARMACEUTICALS, INC.

DOMICILIO THE WOODLANDS, ESTADO DE TEXAS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 31 JUL 2007



PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-078108- -00000-0000

Fecha: 2007-07-31 16:28:17 Dep. 2020 NUECREACION:
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 234

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

07/2007

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **LEXICON PHARMACEUTICALS, INC.**

Dirección: 8800 Technology Forest Place,
The Woodlands, TX 77381-1160, Estados
Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: The Woodlands,
Estado de Texas, Estados Unidos de
América.

Lugar de Constitución:

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: LEE, E-chiang; LANDES, Gregory, M.; CHUNG, Kyu; CHEN, Ling;
DESAI, Urvi; POWELL, David, Reed y HONG, Seokjoo.

Dirección: 3 White Wing Court, The Woodlands, Texas 77382; 87 Lenox Hill
Drive, The Woodlands, Texas 77382; 150 S. Queenscliff Circle, The
Woodlands, Texas 77382; 203 Oakmont Drive, Blue Bell, Pennsylvania 19422;
14 Columnberry Court, The Woodlands, Texas 77384; 5327 Stillbrooke,
Houston, Texas 77096 y 11 Heron Hollow Court, The Woodlands, Texas 77382.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/000184

Fecha: 06/01/06

Publicación Internacional No. WO 2006/074228 A1

Fecha: 13/07/06

⑥

Título (54)

"ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA ANGPTL4"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 16/22

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

07/01/05

(31) Número de Solicitud

60/642,022

⑨

Comprobante de Pago No. 07-55,006

Fecha: 6 de Julio de 2007

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.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción, documento de notificación de registro de cambio de nombre del solicitante con su traducción, opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional con su traducción y listado de secuencias con su traducción.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 55,006
FECHA : JULIO 6 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-078108- -00000-0000

Fecha: 2007-07-31 16:28:17 Dep. 2020 NUECREACION
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 234

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55092738	06/07/2007	4,820,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 16/22	
(22) Fecha de solicitud: 31-07-07		(71) Solicitante(s): LEXICON PHARMACEUTICALS, INC.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 60/642,022	(32) Fecha 07-01-05	(33) País US
		(72) Inventor(es): LEE, E-chiang; LANDES, Gregory, M.; CHUNG, Kyu; CHEN, Ling; DESAI, Urvi; POWELL, David, Reed y HONG, Seokjoo.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 07-08-07	(87) Publicación internacional	
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha: 13-07-06	
	Fecha de presentación de la solicitud: 06-01-06	N° publicación: WO 2006/074228 A1	
	No. de solicitud: PCT/US2006/000184		
(54) Titulo:		ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA ANGPTL4	

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Un anticuerpo monoclonal que se enlaza específicamente a ANGPTL4 y neutraliza al menos una actividad de ANGPTL4.

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente 7705.24-304	PARA FUTURAS ACCIONES	ver Forma PCT/ISA/220 así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.
Solicitud internacional No. PCT/US2006/000184	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 06/01/2006	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 07/01/2005
Solicitante LEXICON GENETICS INCORPORATED		

Este reporte de búsqueda internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este reporte de búsqueda internacional consta de un total de 7 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo con base en:

☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó

☐ una traducción de la solicitud internacional en _____, la cual es el lenguaje de una traducción suministrada para los propósitos de búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b))

b. ☒ Respecto a una secuencia de ácido nucleótido y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver Casilla No. I.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla No. II)

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Casilla No. III)

4. Respecto al título,

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☒ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lea así:

ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA ANGPTL4

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Regla 38.2(b), según aparece en la Casilla No. IV. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☒ ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen.

Casilla No. I Secuencia(s) de ácido nucleótido y/o aminoácido (Continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Con respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia de aminoácido revelados en la solicitud internacional y necesarios para la invención reivindicada, la búsqueda internacional se realizó sobre la base de:
 - a. tipo de material

☒ un listado de secuencias

☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencia
 - b. formato del material

☒ en formato escrito

☒ en una forma legible para computadora
 - c. momento de presentación/suministro

☒ contenido en la solicitud internacional tal como se presentó

☒ presentado junto con la solicitud internacional en forma legible para computadora

☐ suministrado subsecuentemente a esta Autoridad para el propósito de la búsqueda

2. ☐ Adicionalmente, en el caso de que más de una versión o copia de un listado de secuencias y/o tabla en relación con aquello haya sido presentada o suministrada, o se suministraron, tal como es apropiado, las afirmaciones requeridas de que la información en las copias subsecuentes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud tal como se presentó o no va más allá de la solicitud tal como se presentó.

3. Comentarios adicionales:

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/000184

Casilla No. II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del ítem 2 de la primera hoja)

Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.: 55-61 (parcialmente)

porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:
Aunque las reivindicaciones 55-61 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición.

2. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:

3. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Casilla No. III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del ítem 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta ☐ Las tarifas adicionales de búsqueda estaban acompañadas por la protesta del solicitante.

☐ Ninguna protesta acompañaba el pago de tarifas adicionales de búsqueda.

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/US2006/000184

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO

INV. C07K16/22 A61K39/395 A61P3/00 A61P9/10
 ADD. C07K14/515

Según la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)
 C07K A61K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)
 EPO-Internacional, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Dato, WPI Dato, PAJ, Búsqueda de Secuencia

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 03/010205 A (DUKE UNIVERSITY MEDICAL CENTER) 6 de Febrero de 2003 (2003-02-06) ejemplos 6, 7 página 4, línea 4 – línea 11 página 9, línea 4 – línea 5 página 14, línea 22 – página 16, línea 14	1-4, 54
X	WO 99/67382 A (COMPUGEN LTD.) 29 de Diciembre de 1999 (1999-12-29) página 39, línea 9 – página 41, línea 4 página 42, línea 17 – página 43, línea 6 secuencias 5-8 reivindicaciones	1-4, 9-17, 54
	----- -/--	

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.	☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.
° Categorías especiales de documentos citados: 'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular 'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional 'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica) 'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada	'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención 'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo 'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica '&' documento miembro de la misma familia de patentes
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 28 de Abril de 2006	Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 24/05/2006
Nombre y dirección de correo de la ISA/ Oficina de Patentes Europea, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 NV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado Nooij, F

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/000184

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	H. GE Y COL.: "Efecto hiperlipidémico de la proteína-4 de tipo angiopoietina dependiente del estado de la oligomerización." JOURNAL OF LIPID RESEARCH, vol. 45, no. 11, Noviembre de 2004 (2004-11), páginas 2071-2079, XP002378767 citado en la solicitud resumen	1-61
A	----- WO 01/77151 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS INC. Y COL.) 18 de Octubre de 2001 (2001-10-18), ejemplo 9 secuencias 12, 15 figuras 4, 5	1-61
A	----- I. KIM Y COL.: "Expresión hepática, síntesis y secreción de una nueva proteína relacionada con fibrinógeno/angiopoietina que previene la apoptosis de células endoteliales." BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 346, 15 de Marzo de 2000 (2000-03-15), páginas 603-610, XP002154527 citado en la solicitud sección "producción de anticuerpos, inmunohistoquímica y análisis por inmunoelectrotransferencia" figura 1	1-61
A	----- H. GE Y COL.: "Oligomerización y procesamiento proteolítico regulado de proteína-4 de tipo angiopoietina." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 279, no. 3, 16 de Enero de 2004 (2004-01-16), páginas 2038-2045, XP002342840 Baltimore, MD, USA citado en la solicitud página 2039, columna a mano izquierda, línea 20 - línea 22 figura 1	1-61
A	----- T. SHIMIZUGAWA Y COL.: "ANGPTL3 disminuye la depuración de triglicéridos de lipoproteína de muy baja densidad mediante la inhibición de la lipoproteína lipasa." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 37, 13 de Septiembre de 2002 (2002-09-13), páginas 33742-33748, XP002378768 Baltimore, MD, USA citado en la solicitud resumen página 33743, columna a mano derecha, línea 44 - línea 63 ----- -/--	1-61

10

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/US2006/000184

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
T	WO 2006/014729 A (GENENTECH, INC.) 9 de Febrero de 2006 (2006-02-09) ejemplo 3 página 60, línea 3 - línea 5 figura 10	1-4, 54
T	----- WO 2006/014678 A (GENENTECH, INC.) 9 de Febrero de 2006 (2006-02-09) página 68, línea 9 - página 69, línea 2 ejemplos 8, 9 reivindicaciones -----	1-4, 54

AA

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 7705.24-304	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2006/000184	International filing date (day/month/year) 06/01/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 07/01/2005
Applicant LEXICON GENETICS INCORPORATED		

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 7 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. ☒ 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:

MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ANGIOPOIETIN-LIKE PROTEIN 4 (ANGPTL4)

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/000184

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished 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:

114

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/000184

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 55-61 (partially)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 55-61 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

:/US2006/000184

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/22 A61K39/395 A61P3/00 A61P9/10
 ADD. C07K14/515

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/010205 A (DUKE UNIVERSITY MEDICAL CENTER) 6 February 2003 (2003-02-06) examples 6,7 page 4, line 4 - line 11 page 9, line 4 - line 5 page 14, line 22 - page 16, line 14 -----	1-4, 54
X	WO 99/67382 A (COMPUGEN LTD.) 29 December 1999 (1999-12-29) page 39, line 9 - page 41, line 4 page 42, line 17 - page 43, line 6 sequences 5-8 claims ----- -/--	1-4, 9-17, 54



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.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 April 2006

Date of mailing of the international search report

24/05/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

/US2006/000184

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	WO 2006/014729 A (GENENTECH, INC.) 9 February 2006 (2006-02-09) example 3 page 60, line 3 - line 5 figure 10 -----	1-4, 54
T	WO 2006/014678 A (GENENTECH, INC.) 9 February 2006 (2006-02-09) page 68, line 9 - page 69, line 2 examples 8,9 claims -----	1-4, 54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

/US2006/000184

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
W0 03010205	A	06-02-2003	US	2003207840 A1	06-11-2003
W0 9967382	A	29-12-1999	AU	4643699 A	10-01-2000
W0 0177151	A	18-10-2001	AU	4992901 A	23-10-2001
W0 2006014729	A	09-02-2006	NONE		
W0 2006014678	A	09-02-2006	NONE		

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
13 de Julio de 2006 (13.07.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/074228 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C07K 16/22 (2006.01) **A61P 9/10** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **C07K 14/515** (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(74) Agente: **STEVENS, Lauren, L.**; Finnegan, Henderson, Farabow, Garrett & Dunner LLP, 901 New York Avenue, Washington, DC 20001-4413 (US).

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2006/000184

(22) Fecha de Registro Internacional:

6 de Enero de 2006 (06.01.2006)

(25) Idioma de Registro:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(30) Información de Prioridad:

60/642,022 7 de Enero de 2005 (07.01.2005) US

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): **LEXICON GENETICS INCORPORATED** [US/US]; 8800 Technology Forest Place, The Woodlands, TX 77381-1160 (US).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): **LEE, E-chiang** [CN/US]; 3 White Wing Court, The Woodlands, Texas 77382 (US). **LANDES, Gregory, M.** [US/US]; 87 Lenox Hill Drive, The Woodlands, Texas 77382 (US). **CHUNG, Kyu** [US/US]; 150 S. Queenscliff Circle, The Woodlands, Texas 77382 (US). **CHEN, Ling** [US/US]; 203 Oakmont Drive, Blue Bell, Pennsylvania 19422 (US). **DESAI, Urvi** [IN/US]; 14 Columberry Court, The Woodland, Texas 77384 (US). **POWELL, David, Reed** [US/US]; 5327 Stillbrooke, Houston, Texas 77096 (US). **HONG, Seokjoo** [KR/US]; 11 Heron Hollow Court, The Woodlands, Texas 77382 (US).

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser republicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA ANGPTL4

(57) Resumen: Se proveen anticuerpos monoclonales que se enlazan específicamente a ANGPTL4. Se proveen anticuerpos monoclonales que neutralizan al menos una actividad de ANGPTL4. Se proveen los métodos para el tratamiento de un trastorno de metabolismo de lípido usando anticuerpos monoclonales neutralizantes.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 July 2006 (13.07.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/074228 A1

(51) International Patent Classification:

C07K 16/22 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 14/515 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(74) Agent: STEVENS, Lauren, L.; Finnegan, Henderson,
Farabow, Garrett & Dunner LLP, 901 New York Avenue,
Washington, DC 20001-4413 (US).

(21) International Application Number:

PCT/US2006/000184

(22) International Filing Date: 6 January 2006 (06.01.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/642,022 7 January 2005 (07.01.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): LEX-
ICON GENETICS INCORPORATED [US/US]; 8800
Technology Forest Place, The Woodlands, TX 77381-1160
(US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LEE, E-chiang
[CN/US]; 3 White Wing Court, The Woodlands, Texas
77382 (US). LANDES, Gregory, M. [US/US]; 87 Lenox
Hill Drive, The Woodlands, Texas 77382 (US). CHUNG,
Kyu [US/US]; 150 S. Queenscliff Circle, The Woodlands,
Texas 77382 (US). CHEN, Ling [US/US]; 203 Oakmont
Drive, Blue Bell, Pennsylvania 19422 (US). DESAI, Urvi
[IN/US]; 14 Columberry Court, The Woodland, Texas
77384 (US). POWELL, David, Reed [US/US]; 5327
Stillbrookc, Houston, Texas 77096 (US). HONG, Seokjoo
[KR/US]; 11 Heron Hollow Court, The Woodlands, Texas
77382 (US).

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ANGIOPOIETIN-LIKE PROTEIN 4 (ANGPTL4)

(57) Abstract: Monoclonal antibodies that specifically bind to ANGPTL4 are provided. Monoclonal antibodies that neutralize at least one activity of ANGPTL4 are provided. Methods of treating a disorder of lipid metabolism using neutralizing monoclonal antibodies are provided.

WO 2006/074228 A1

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

NOTIFICACIÓN DEL REGISTRO DE UN CAMBIO

(Regla 92bis.1 del PCT e Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Para:

STEVENS, Lauren, L.
Finnegan, Henderson, Farabow, Garrett & Dunner LLP
901 New York Avenue
Washington, DC 20001-4413
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Fecha de correo (día/mes/año)
31 de Mayo de 2007 (31.05.2007)

Archivo de referencia del solicitante o agente
7705.24-304

NOTIFICACION IMPORTANTE

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/000184

Fecha de registro internacional (día/mes/año)
6 de Enero de 2006 (06.01.2006)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante ☐ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común

Nombre y Dirección LEXICON GENETICS INCORPORATED 8800 Technology Forest Place The Woodlands, TX 77381-1160 Estados Unidos de América	País de Nacionalidad US	País de Residencia US
	No. Teléfono 281-863-3000	
	No. Facsímile 281-836-8088	
	No. Teleimpresora	

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☐ la persona ☒ el nombre ☐ la dirección ☐ la nacionalidad ☐ la residencia

Nombre y Dirección LEXICON PHARMACEUTICALS, INC. 8800 Technology Forest Place The Woodlands, TX 77381-1160 Estados Unidos de América	País de Nacionalidad US	País de Residencia US
	No. Teléfono 281-863-3000	
	No. Facsímile 281-836-8088	
	No. Teleimpresora	

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina que recibe ☒ las Oficinas designadas relacionadas
☐ la Autoridad de Búsqueda Internacional ☐ las Oficinas seleccionadas relacionadas
☐ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ☐ otros:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsímile No. +41 22 338 82 70	Funcionario autorizado Gallay Laurence Facsímile No. +41 22 338 71 30 Teléfono No. +41 22 338 74 09
---	--

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

STEVENS, Lauren, L.
Finnegan, Henderson, Farabow, Garrett & Dunner
LLP
901 New York Avenue
Washington, DC 20001-4413
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 31 May 2007 (31.05.2007)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 7705.24-304	
International application No. PCT/US2006/000184	International filing date (day/month/year) 06 January 2006 (06.01.2006)

1. The following indications appeared on record concerning: ☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative		
Name and Address LEXICON GENETICS INCORPORATED 8800 Technology Forest Place The Woodlands, TX 77381-1160 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No. 281-863-3000	
	Facsimile No. 281-836-8088	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: ☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence		
Name and Address LEXICON PHARMACEUTICALS, INC. 8800 Technology Forest Place The Woodlands, TX 77381-1160 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No. 281-863-3000	
	Facsimile No. 281-836-8088	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: ☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned ☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned ☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Gallay Laurence Facsimile No. +41 22 338 71 30 Telephone No. +41 22 338 74 09
---	--

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para:

PCT

ver forma PCT/ISA/220

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Regla 43bis.1)

Fecha de correo
(día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)

Registro de referencia del solicitante
o agente
ver forma PCT/ISA/220

PARA FUTURAS ACCIONES
Ver párrafo 2 a continuación

Solicitud Internacional No.

Fecha de registro internacional
(día/mes/año)

Fecha de prioridad
(día/mes/año)

PCT/US2006/000184

06.01.2006

07.01.2005

Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC
INV. C07K16/22 A61K39/395 A61P3/00 A61P9/10
ADD. C07K14/515

Solicitante

LEXICON GENETICS INCORPORATED

1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

- ☒ Casilla No. I Bases de la opinión
- ☒ Casilla No. II Prioridad
- ☒ Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial
- ☐ Casilla No. IV Falta de unidad de invención
- ☒ Casilla No. V Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación
- ☐ Casilla No. VI Ciertos documentos citados
- ☐ Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional
- ☒ Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

2. **ACCIONES FUTURAS**

Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional.

Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde.

Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220.

3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.

Nombre y dirección de correo de la ISA:

Oficina Europea de Patentes - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Fecha de terminación
de esta opinión

ver forma
PCT/ISA/210

Funcionario Autorizado

Nooij, F

Teléfono No. +31 70 340-3267

Casilla No. I Bases de la opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión ha sido establecida sobre las bases de:
☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó

☐ una traducción de la solicitud internacional en _____, el cual es el idioma de una traducción proporcionada para los propósitos de búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b)).
2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:
 - a. tipo de material:
☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia
 - b. formato de material:
☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador
 - c. tiempo de presentación/suministro:
☒ contenido en la solicitud internacional según se registró.
☒ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..
3. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.
4. Comentarios adicionales:

Casilla No. II Prioridad

1. ☒ La validez de la reivindicación de prioridad no ha sido considerada ya que la Autoridad de Búsqueda Internacional no tiene a su disposición una copia de la solicitud anterior cuya prioridad ha sido reivindicada o, donde sea necesario, una traducción de la solicitud anterior. Sin embargo, esta opinión ha sido establecida bajo la suposición que la fecha relevante (Reglas 43bis.1 y 64.1) es la fecha de prioridad reivindicada.
2. ☐ Esta opinión ha sido establecida como sino se hubiera reclamado prioridad debido a que la reivindicación de prioridad ha sido encontrada inválida (Reglas 43bis.1 y 64.1). De esta manera, para los propósitos de esta opinión, la fecha de presentación internacional indicada arriba es considerada la fecha relevante.
3. Observaciones adicionales, de ser necesario:

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un nivel inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 55-61 (parcialmente, por razones de aplicabilidad industrial)

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 55-61 (parcialmente, por razones de aplicabilidad industrial) se refieren a la siguiente materia objeto la cual no requiere un examen preliminar internacional (*especificar*):

ver hoja separada

- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de dichas reivindicaciones Nos. son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especificar*):
- ☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa.
- ☐ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos.
- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin el listado de secuencia; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no:
- ☐ suministró un listado de secuencias en papel para cumplir con el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicho listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
 - ☐ suministró un listado de secuencias en formato electrónico para cumplir en el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas y tal listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
 - ☐ pagó la tarifa de suministro tardío para el suministro de un listado de secuencia en respuesta a una invitación de acuerdo con las Reglas 13^{ter}.1(a) o (b).
- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con los listados de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no suministró dichas tablas en formato electrónico para cumplir con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas y dichas tablas no estuvieron disponibles para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
- ☐ las tablas que se relacionan con el listado de secuencias de aminoácidos y/o nucleótidos, si están solamente en formato electrónico, no cumplen con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Ver Casilla Suplementaria para detalles adicionales

Casilla No. V Afirmación razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Declaración
- Novedad (N)

Si: Reivindicaciones 1-61

No: Reivindicaciones

Nivel Inventivo (IS)

Si: Reivindicaciones 20-22

No: Reivindicaciones 1-19, 23-61

Aplicabilidad Industrial (IA)

Si: Reivindicaciones 1-54

No: Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones
- ver hoja separada

Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

Las siguientes observaciones sobre la claridad de las reivindicaciones, descripción, y dibujos o sobre la pregunta sea que las reivindicaciones estén totalmente soportadas por la descripción, son hechas:

ver hoja separada

Re Ítem III

No establecimiento de opinión con respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

Las actuales reivindicaciones 55-61 se relacionan con materia objeto que esta Autoridad considera está cubierta por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) del PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) del PCT).

Re Ítem V

Declaración razonada con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; referencias y explicaciones que sustentan dicha declaración

Se hace referencia a los siguientes documentos en esta opinión escrita:

- D1: WO 03/010205 A (DUKE UNIVERSITY MEDICAL CENTER) Febrero 6, 2003 (2003-02-06)
D2: WO 99/67382 A (COMPUGEN LTD.) Diciembre 29, 1999 (1999-12-29)
D3: WO 01/77151 A (MILLENIUM PHARMACEUTICALS INC. Y COLS.) Octubre 18, 2001 (2001-10-18)

1. NOVEDAD (Artículo 33(2) del PCT)

- 1.1 D1 revela el uso terapéutico anticáncer de un anticuerpo monoclonal (mAb) contra HFARP, que de acuerdo con D3 (*ver página 2071, columna LH*) es un sinónimo para la proteína 4 tipo angiopoyetina (ANGPTL4). Dicho mAb puede utilizarse a.o para el tratamiento de tumores cerebrales. No se ha mostrado el bloqueo de una función HFARP por un mAb específico, pero se ha sugerido claramente (*ver ejemplo 7, página 4, líneas 4-11; página 9, líneas 4-5; página 14, línea 22- página 16, línea 14*).
- 1.2 D2 revela factores de crecimiento tipo angiopoyetina y sus secuencias de aminoácidos. Este documento muestra ejemplos hipotéticos de anticuerpos para estos factores, y su uso terapéutico teórico (*ver página 39, línea 9- página 41, línea 4; página 42, línea 17- página 43, línea 6; secuencias 5-8; reivindicaciones*).

1.3 En vista del arte previo citado, la materia objeto de las actuales reivindicaciones 1-61 se considera novedosa, y por lo tanto cumple con los requisitos del Artículo 33(2) del PCT.

2. NIVEL INVENTIVO (Artículo 33(3) del PCT)

2.1 La actual reivindicación independiente 1 se relaciona con anticuerpo monoclonal que se enlaza específicamente a ANGPTL4 y neutraliza al menos una actividad de ANGPTL4.

2.1.1 Con respecto a dicha reivindicación, se considera que D1 representa el estado de la técnica más relevante, y revela un mAb contra HFARP (=ANGPTL4).

2.1.2 La materia objeto de la reivindicación 1 difiere del arte previo en que el mAb neutraliza al menos una actividad de ANGPTL4. El efecto técnico de dicha diferencia es la modulación de al menos una función de ANGPTL4 tras el enlace del mAb a la ANGPTL4.

2.1.3 El problema a ser resuelto mediante la presente invención puede por lo tanto verse como proveer un mAb contra ANGPTL4 que module al menos una función de ANGPTL4.

2.1.4 La solución propuesta es un mAb anti-ANGPTL4 que neutralice al menos una función de ANGPTL4.

2.1.5 Sin embargo, no se puede considerar que está solución involucre un nivel inventivo en el sentido del Artículo 33(3) del PCT por las siguientes razones: D1 ya sugería que los anticuerpos contra a.o. HFARP (=ANGPTL4) pueden ser usados para inhibir la angiogénesis (*ver página 4, líneas 4-11*) o para inhibir el crecimiento de células tumorales (*ver página 5, líneas 11-15*).

2.1.6 D1 también menciona fragmentos de anticuerpos y versiones quiméricas y humanas (humanizadas) de los mismos (*ver reivindicaciones, página 15*). El enlace del mAb a un epítipo específico de ANGPTL4 no ha mostrado que le confiera una característica inesperada o ventajosa a dicho mAb. Además, las designaciones internas del mAb, 14D12, 90B4 y 15F2 no le confieren a los anticuerpos ninguna característica técnica que los haga inventivos sobre el arte previo. Adicionalmente, las actuales reivindicaciones 5 y 6 intentan definir la materia objeto en términos del resultado a ser alcanzado, lo cual apenas cuenta como una declaración del problema subyacente, sin proveer las características técnicas necesarias para alcanzar este resultado. Por lo tanto, no se puede reconocer un nivel inventivo para las actuales reivindicaciones dependientes 2-17, y en consecuencia no se considera que las actuales reivindicaciones dependientes 2-17 involucren un nivel inventivo a la luz del Artículo 33(3) del PCT.

- 2.2 Las actuales reivindicaciones independientes 18 y 38 se relacionan con un anticuerpo que se enlaza específicamente a ANGPTL4, en donde el anticuerpo neutraliza al menos una actividad de ANGPTL4, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada y una ligera, y en donde la cadena pesada (actual reivindicación 18) o la cadena ligera (actual reivindicación 38) comprende ciertas secuencias de aminoácidos definidas.
- 2.2.1 Con respecto a dichas reivindicaciones, se considera que D1 representa el estado de la técnica más relevante, y revela un mAb contra HFARP (=ANGPTL4). D1 también sugiere que los anticuerpos contra a.o. HFARP (=ANGPTL4) pueden ser usados para inhibir las funciones de HFARP como la angiogénesis (*ver página 4, líneas 4-11*) o para inhibir el crecimiento de células tumorales (*ver página 5, líneas 11-15*) (*ver comentario 2.1.5, realizado anteriormente*).
- 2.2.2 La materia objeto de la reivindicación 1 difiere del arte previo en que la cadena pesada o ligera del anticuerpo comprende ciertas secuencias de aminoácidos definidas. El efecto técnico de dicha diferencia es desconocido.
- 2.2.3 El problema a ser resuelto mediante la presente invención puede por lo tanto verse como proveer un anticuerpo contra ANGPTL4 definido parcialmente mediante características estructurales.
- 2.2.4 La solución propuesta es un anticuerpo neutralizante anti-ANGPTL4 que comprende una cadena pesada y una ligera, y en donde la cadena pesada (actual reivindicación 18) o la cadena ligera (actual reivindicación 38) comprende ciertas secuencias de aminoácidos definidas.
- 2.2.5 D1 ya sugería que anticuerpos contra a.o. HFARP (=ANGPTL4) pueden ser usados para inhibir la angiogénesis (*ver página 4, líneas 4-11*) o inhibir el crecimiento de células tumorales (*ver página 5, líneas 11-15*). La simple caracterización de dicho anticuerpo neutralizante anti-ANGPTL4 mediante la provisión de los aminoácidos de su V_H, V_L o CDRs no es inventiva. Esto podría ser diferente si dicho anticuerpo exhibiera propiedades ventajosas inesperadas. Sin embargo, dichas propiedades no han sido demostradas ni se han hecho plausibles, excepto por los anticuerpos como se definieron en las actuales reivindicaciones 20-22. Cada una de las últimas reivindicaciones se refiere a las secuencias V_H y V_L de los mAbs 14D12, 15F2 y 90B4, respectivamente. Dichos mAbs pueden aumentar la actividad LPL y disminuir el nivel de al menos un lípido de suero in vivo. Estos efectos ventajosos no han sido revelados o sugeridos antes y por lo tanto involucran un nivel inventivo. Por lo tanto, las actuales reivindicaciones 20-22 cumplen con los requisitos del Artículo 33(3) del PCT. Sin embargo, no se puede reconocer un nivel inventivo para las actuales reivindicaciones 18, 19 y 23-49.

- 2.3 Las actuales reivindicaciones **50-53** se refieren a un mAb neutralizante anti-ANGPTL4, en donde el mAb se enlaza a un péptido específico. Se ha mostrado en los ejemplos de la solicitud subyacente que el mAb neutralizante anti-ANGPTL4 15F2 se enlaza a un péptido con SEQ ID NO: 40 y que el mAb neutralizante anti-ANGPTL4 90B4 se puede enlazar a un péptido con SEQ ID NO: 41 y/o 43. Sin embargo, el mAb neutralizante anti-ANGPTL4 14D12, que se supone se enlaza al mismo epítipo que el mAb 15F2, no se puede enlazar a ninguno de estos péptidos. Los resultados para el mAb 14D12 originan la duda acerca de si algún mAb resuelve el problema de proveer un mAb neutralizante anti ANGPTL4 que se enlace a un péptido específico. Por lo tanto, para las actuales reivindicaciones **50-53** solo se puede encontrar sustento para un número limitado de mAbs, pero no para la totalidad del alcance de dichas reivindicaciones. Por lo tanto, no se puede reconocer un nivel inventivo para las actuales reivindicaciones **50-53** a la luz del Artículo 33 (3) del PCT.
- 2.4 Teniendo en mente el razonamiento de los comentarios 2.1-2.3, no se puede reconocer nivel inventivo para la materia objeto de la actual reivindicación **54**, excepto cuando se refiere a los anticuerpos inventivos como se definieron en las actuales reivindicaciones **20-22**.
- 2.5 De manera similar, no se puede reconocer un nivel inventivo para la materia objeto de las actuales reivindicaciones **55-60**, excepto cuando se refiere a los anticuerpos inventivos como los de las actuales reivindicaciones **20-22**.
- 2.6 Dado que no se puede encontrar sustento de que cualquier anticuerpo puede tratar la enfermedad de corazón isquémico (reivindicación **61**), no se resuelve el problema y por lo tanto no se puede reconocer nivel inventivo para dicha reivindicación en absoluto.

2.7 En conclusión, la materia objeto de las actuales reivindicaciones **20-22** involucra un nivel inventivo y por lo tanto dichas reivindicaciones cumplen con los requisitos del Artículo 33(3) del PCT. Sin embargo, las actuales reivindicaciones **1-19** y **23-61** no cumplen con dichos requisitos.

3. APLICABILIDAD INDUSTRIAL (Artículo 33(4) del PCT)

Para la evaluación de la aplicabilidad industrial de las presentes reivindicaciones **55-61**, no existe un criterio unificado en los estados contratantes del PCT. La patentabilidad puede depender también de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de reivindicaciones para el uso de un compuesto en tratamiento médico; sin embargo, puede permitir reivindicaciones de primer uso en tratamiento médico de un compuesto conocido y el uso de tal compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

Re Ítem VIII

Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

4. CLARIDAD Y SUSTENTO (Artículo 6 del PCT)

4.1. Las actuales reivindicaciones **5, 6, 11, 12, 30, 31, 34, 35, 42, 43, 46** y **47** no cumplen con los requisitos del Artículo 6 del PCT puesto que la materia para la cual se busca protección no está definida claramente. Las reivindicaciones intentan definir la materia objeto en términos del resultado a ser alcanzado, lo cual apenas contribuye a establecer el problema subyacente, sin proveer las características técnicas necesarias para alcanzar este resultado.

4.2. No es suficiente caracterizar un anticuerpo mediante **uno** de los dominios variables o mediante **una** o **dos** de las secuencias CDR, ya que un anticuerpo está hecho estructuralmente de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas y necesita **al menos 3 CDRs** por cadena y en el marco apropiado para conferir especificidad de enlace a antígeno. A menos que se muestre lo contrario, se considera que un CDR no es ni equivalente a un anticuerpo, ni suficiente para definir la especificidad de un anticuerpo. Por lo tanto las actuales reivindicaciones **18, 19, 23-49** no cumplen con los requisitos del Artículo 6 del PCT.

- 4.3 Los términos 14D12, 90B4 y 15F2 en las actuales reivindicaciones **9-12, 34, 35, 46 y 47** son únicamente una designación interna para anticuerpos monoclonales los cuales en sí mismos no proveen información técnica para la persona versada en la materia. Por lo tanto, estos términos no son claros a la luz del Artículo 6 del PCT. Una definición de dichos anticuerpos mediante sus características estructurales, p.ejm., sus dominios **completos V_H y V_L**, pueden proveer la base para un conjunto de reivindicación(es) claro.
- 4.4 No fue posible encontrar sustento en la descripción para un método de tratamiento de la enfermedad del corazón isquémico. En consecuencia, la actual reivindicación **61** no cumple con los requisitos del Artículo 6 del PCT.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

see form PCT/ISA/220

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/US2006/000184

International filing date (day/month/year)
06.01.2006

Priority date (day/month/year)
07.01.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/22 A61K39/395 A61P3/00 A61P9/10
ADD. C07K14/515

Applicant
LEXICON GENETICS INCORPORATED

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 or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

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 66.1bis(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 - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

See form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Nooij, F

Telephone No. +31 70 340-3267



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2006/000184

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. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ 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.
4. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2006/000184

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 55-61 (partially, for reasons of industrial applicability)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 55-61 (partially, for reasons of industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
 - ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13^{ter}.1(a) or (b).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2006/000184

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	1-61
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	20-22
	No: Claims	1-19,23-61
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-54
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

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

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Present claims **55-61** relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1 (iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

The following documents are referred to in this written opinion:

- D1: WO 03/010205 A (DUKE UNIVERSITY MEDICAL CENTER) 6 February 2003 (2003-02-06)
D2: WO 99/67382 A (COMPUGEN LTD.) 29 December 1999 (1999-12-29)
D3: WO 01/77151 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS INC. ET AL.) 18 October 2001 (2001-10-18)

1. NOVELTY (Article 33(2) PCT)

- 1.1 D1 discloses the therapeutic anti-cancer use of a monoclonal antibody (mAb) against HFARP, which according to D3 (see page 2071, LH-column) is a synonym for angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4). Said mAb may be used a.o. for treatment of brain tumors. The blocking of a HFARP function by a specific mAb has not been shown, but is clearly suggested (see example 7; page 4, line 4-11; page 9, line 4-5; page 14, line 22 - page 16, line 14).
- 1.2 D2 discloses angiopoietin-like growth factors and their amino acid sequences. It shows hypothetical examples on antibodies to these factors, and their putative therapeutic use (see page 39, line 9 - page 41, line 4; page 42, line 17 - page 43, line 6; sequences 5-8; claims).

- 1.3 In view of the cited prior art, the subject-matter of present claims **1-61** is considered to be novel, and hence to fulfill the requirements of Article 33(2) PCT.

2. INVENTIVE STEP (Article 33(3) PCT)

- 2.1 Present independent claim **1** relates to a monoclonal antibody that specifically binds to ANGPTL4 and neutralizes at least one activity of ANGPTL4.

2.1.1 With regard to said claim, *D1* is considered to represent the most relevant state of the art, and discloses a mAb against HFARP (= ANGPTL4).

2.1.2 The subject-matter of claim **1** differs from the prior art in that the mAb neutralizes at least one activity of ANGPTL4. The technical effect of said difference is the modulation of at least one function of ANGPTL4 upon binding of the mAb to ANGPTL4.

2.1.3 The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as providing a mAb against ANGPTL4 which modulates at least one function of ANGPTL4.

2.1.4 The proposed solution is an anti-ANGPTL4 mAb that neutralizes at least one function of ANGPTL4.

2.1.5 This solution cannot, however, be considered to involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT for the following reasons: *D1* already suggests that antibodies against a.o. HFARP (= ANGPTL4) may be used to inhibit angiogenesis (*see page 4, lines 4-11*) or to inhibit tumor cell growth (*see page 5, lines 11-15*).

2.1.6 *D1* also mentions antibody fragments and human(ized) and chimeric versions thereof (*see the claims; page 15*). The binding of the mAb to a specific epitope of ANGPTL4 has not been shown to confer an unexpected, or advantageous feature to said mAb. Also, the internal mAb designations 14D12, 90B4 and 15F2 do not confer any technical features on the antibodies to make them

inventive over the prior art. Furthermore, present claims **5** and **6** attempt to define the subject-matter in terms of the result to be achieved, which merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving this result. Hence, no inventive step can be acknowledged for present dependent claims **2-17** and, consequently, present dependent claims **2-17** are considered not to involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

- 2.2 Present independent claims **18** and **38** relate to an antibody that specifically binds to ANGPTL4, wherein the antibody neutralizes at least one activity of ANGPTL4, wherein said antibody comprises a heavy and a light chain, and wherein the heavy chain (present claim **18**) or light chain (present claim **38**) comprises certain defined amino acid sequences.
- 2.2.1 With regard to said claims, *D1* is considered to represent the most relevant state of the art, and discloses a mAb against HFARP (= ANGPTL4). *D1* also suggests that antibodies against a.o. HFARP (= ANGPTL4) may be used to inhibit HFARP functions like angiogenesis (*see page 4, lines 4-11*) or to inhibit tumor cell growth (*see page 5, lines 11-15*) (*see remark 2.1.5, above*).
- 2.2.2 The subject-matter of claim **1** differs from the prior art in that the antibody's heavy or light chain comprises certain defined amino acid sequences. The technical effect of said difference is unknown.
- 2.2.3 The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as providing an antibody against ANGPTL4 partially defined by structural features.
- 2.2.4 The proposed solution is a neutralizing anti-ANGPTL4 antibody that comprises a heavy and a light chain, and wherein the heavy chain (present claim **18**) or light chain (present claim **38**) comprises certain defined amino acid sequences.
- 2.2.5 *D1* already suggests that antibodies against a.o. HFARP (= ANGPTL4) may be used to inhibit angiogenesis (*see page 4, lines 4-11*) or to inhibit tumor cell

growth (*see page 5, lines 11-15*). The mere characterization of said neutralizing anti-ANGPTL4 antibody by the provision of the amino acids of its V_H , V_L or CDRs is not inventive. This could be different if said antibody would exhibit unexpected advantageous properties. However, said properties have not been demonstrated nor have become plausible otherwise, except for the antibodies as defined in present claims **20-22**. The latter claims refer each to the V_H and V_L sequences of mAbs 14D12, 15F2 and 90B4, respectively. Said mAbs can increase LPL activity and decrease the level of at least one serum lipid in vivo. These advantageous effects have not been disclosed or suggested before and involve therefore an inventive step. Present claims **20-22** therefore fulfill the requirements of Article 33(3) PCT. However, no inventive step can be acknowledged for present claims **18, 19 and 23-49**.

- 2.3 Present claims **50-53** refer to a neutralizing anti-ANGPTL4 mAb, wherein the mAb binds to a specified peptide. It has been shown in the examples of the underlying application that neutralizing anti-ANGPTL4 mAb 15F2 binds to a peptide with SEQ ID NO: 40 and that neutralizing anti-ANGPTL4 mAb 90B4 can bind to a peptide with SEQ ID NO: 41 and/or 43. However, neutralizing anti-ANGPTL4 mAb 14D12, which is supposed to bind to the same epitope as mAb 15F2, cannot bind to any of these peptides. The results for mAb 14D12 raises doubt whether any mAb solves the problem of providing a neutralizing anti-ANGPTL4 mAb that binds to a specified peptide. Support for present claims **50-53** can thus be found for only a limited number of mAbs, but not for the entirety of the scope of said claims. Hence, no inventive step can be acknowledged for present claims **50-53** in the sense of Article 33(3) PCT.
- 2.4 Bearing in mind the reasoning under remarks 2.1-2.3, no inventive step can be acknowledged for the subject-matter of present claim **54**, except when it refers back to the inventive antibodies as defined in present claims **20-22**.
- 2.5 Similarly, no inventive step can be acknowledged for the subject-matter of present claims **55-60**, except when it refers back to the inventive antibodies of present claims **20-22**.
- 2.6 Since no support could be found that any antibody is able to treat ischaemic heart

disease (claim **61**), no problem is solved, and hence no inventive step can be acknowledged for said claim at all.

- 2.7 In conclusion, the subject-matter of present claims **20-22** involves an inventive step and hence said claims fulfill the requirements of Article 33(3) PCT. However, present claims **1-19** and **23-61** do not fulfill said requirements.

3. INDUSTRIAL APPLICABILITY (Article 33(4) PCT)

For the assessment of the present claims **55-61** on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

4. CLARITY AND SUPPORT (Article 6 PCT)

- 4.1 Present claims **5, 6, 11, 12, 30, 31, 34, 35, 42, 43, 46** and **47** do not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The claims attempt to define the subject-matter in terms of the result to be achieved, which merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving this result.
- 4.2 It is not sufficient to characterise an antibody by **one** of the variable domains or by **one** or **two** of the CDR sequences, since an antibody is structurally made of two light and two heavy chains and it needs **at least 3 CDRs** per chain and in the proper framework to confer antigen binding specificity. Unless the contrary is shown, it is considered that a CDR is neither equivalent to an antibody, nor sufficient to define the specificity of an antibody. Present claims **18, 19, 23-49** therefore do not fulfill the

requirements of Article 6 PCT.

- 4.3 The terms 14D12, 90B4 and 15F2 in present claims **9-12, 34, 35, 46** and **47** are merely an internal designation for monoclonal antibodies which in themselves convey no technical information for the skilled person. Thus, these terms are unclear in the sense of Article 6 PCT. A definition of said antibodies by their structural features, e.g. their **full V_H and V_L** domains, may provide the basis for a clear (set of) claim(s).
- 4.4 No support in the description could be found for a method of treating ischaemic heart disease. Consequently, present claim **61** does not fulfill the requirements of Article 6 PCT.

ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA ANGPTL4

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Se proveen anticuerpos monoclonales que se enlazan específicamente a ANGPTL4. Se proveen anticuerpos monoclonales que neutralizan al menos una actividad de ANGPTL4. Se proveen los métodos para el tratamiento de un trastorno de metabolismo de lípido usando anticuerpos monoclonales neutralizantes.

ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA ANGPTL4

[001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional U.S. No. 60/642,022, presentada el 7 de Enero de 2005, que está incorporada por referencia aquí para cualquier propósito.

I. CAMPO TECNICO

[002] Se proveen anticuerpos monoclonales que se enlazan específicamente a la proteína 4 del tipo angiopoyetina (ANGPTL4). Se proveen métodos para usar los anticuerpos monoclonales que se enlazan a la proteína 4 del tipo angiopoyetina (ANGPTL4). Se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos monoclonales que se enlazan específicamente a la proteína 4 del tipo angiopoyetina (ANGPTL4).

II. INTRODUCCION

[003] La proteína 4 del tipo angiopoyetina está conservada entre varias especies mamíferas. Ge et al. (2004) J. Biol. Chem. 279:2038-2045. La proteína 4 del tipo angiopoyetina contiene un dominio de hélice enrollada N terminal y un dominio del tipo fibrinógeno C terminal. Kim et al. (2000) Biochem. J. 346:603-610. El dominio de hélice enrollada N terminal media la oligomerización de la proteína 4 del tipo angiopoyetina. Ge et al. (2004) J. Biol. Chem. 279:2038-2045. La proteína 4 del tipo angiopoyetina se somete al procesamiento proteolítico *in vivo*, produciendo el clivado del dominio del tipo fibrinógeno. Ge et al. (2004) J. Biol. Chem. 279:2038-2045.

III. RESUMEN

[004] En ciertas realizaciones, se provee un anticuerpo monoclonal que se enlaza específicamente a ANGPTL4 y neutraliza al menos una actividad de ANGPTL4. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal de ratón. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humanizado. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aumenta la actividad de LPL. En ciertas realizaciones,

el anticuerpo monoclonal disminuye el nivel de al menos un lípido en suero *in vivo*.

[005] En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal se enlaza a un epítipo dentro de una región de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 50 desde el residuo 21 al residuo 174. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal se enlaza a un epítipo dentro de una región de la SEQ ID NO:2 desde el residuo 21 al residuo 169. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es 14D12. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es 15F2. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es 90B4. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal se enlaza específicamente al mismo epítipo que 14D12. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal se enlaza específicamente al mismo epítipo que 15F2. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal se enlaza específicamente al mismo epítipo que 90B4.

[006] En ciertas realizaciones, se provee un anticuerpo que enlaza específicamente un ANGPTL4, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 12 a 14; al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 21, 39, y 20; o al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 27 a 29; en donde el anticuerpo neutraliza al menos una actividad de ANGPTL4. En ciertas realizaciones, se provee un anticuerpo que enlaza específicamente un ANGPTL4 que comprende una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 16 a 18; al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 30 a 32; o al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 33 a 35, en donde el anticuerpo neutraliza al menos una actividad de ANGPTL4.

[007] En ciertas realizaciones, se provee un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 12 a 14. En ciertas realizaciones, se provee un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende al

menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 21, 39, y 20. En ciertas realizaciones, se provee un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 27 a 29. En ciertas realizaciones, se provee un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 16 a 18. En ciertas realizaciones, se provee un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 30 a 32. En ciertas realizaciones, se provee un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende al menos un CDR que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 33 a 35.

[008] En ciertas realizaciones, un anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 12. En ciertas realizaciones, un anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 13. En ciertas realizaciones, un anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 14.

[009] En ciertas realizaciones, un anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 16. En ciertas realizaciones, un anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 17. En ciertas realizaciones, un anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 18.

[010] En ciertas realizaciones, se provee un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1 como se indica en la SEQ ID NO: 21, una CDR2 como se indica en la SEQ ID NO: 39, y una CDR3 como se indica en la SEQ ID NO: 20. En ciertas realizaciones, la X es la SEQ ID NO: 20 es cualquier amino ácido. En ciertas realizaciones, la X es la SEQ ID NO: 20 es un amino ácido hidrofóbico. En ciertas realizaciones, la X es la SEQ ID NO:

20 es glicina, leucina, isoleucina, valina, o alanina. En ciertas realizaciones, la X es la SEQ ID NO: 20 es valina o isoleucina. En ciertas realizaciones, la X es la SEQ ID NO: 20 es valina o isoleucina. En ciertas realizaciones, la X en la SEQ ID NO: 39 es cualquier amino ácido. En ciertas realizaciones, la X en la SEQ ID NO: 39 es glicina, aspartato, o tirosina. En ciertas realizaciones, se provee un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una CDR1 como se indica en la SEQ ID NO: 27, una CDR2 como se indica en la SEQ ID NO: 28, y una CDR3 como se indica en la SEQ ID NO: 29.

[011] En ciertas realizaciones, se provee un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una CDR1 como se indica en la SEQ ID NO: 30, una CDR2 como se indica en la SEQ ID NO: 31, y una CDR3 como se indica en la SEQ ID NO: 32. En ciertas realizaciones, se provee un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una CDR1 como se indica en la SEQ ID NO: 33, una CDR2 como se indica en la SEQ ID NO: 34, y una CDR3 como se indica en la SEQ ID NO: 35.

[012] En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En ciertas realizaciones, uno es un fragmento scFv. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fab. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento F(ab')₂. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fab'.

[013] En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra ANGPTL4 se enlaza a un péptido que tiene la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 40. En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra ANGPTL4 se enlaza a un péptido que tiene la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 41. En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra ANGPTL4 se enlaza a un péptido que tiene la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 43. En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra ANGPTL4 se enlaza a un péptido que tiene la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 41 y se enlaza a un péptido que tiene la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 43.

[014] En ciertas realizaciones, se provee una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal que enlaza específicamente un ANGPTL4 y neutraliza al menos una actividad de ANGPTL4. En ciertas realizaciones, se provee un método para el tratamiento de un trastorno del

metabolismo de lípido, en donde el método comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, se provee un método para disminuir el nivel de uno o más lípidos en suero, en donde el método comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, se provee un método para el tratamiento de la hipertrigliceridemia, en donde el método comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, se provee un método para el tratamiento de la hipercolesterolemia, en donde el método comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, se provee un método para el tratamiento de la obesidad, en donde el método comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, se provee un método para el tratamiento de la diabetes, en donde el método comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición farmacéutica.

IV. BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[015] La Figura 1 muestra los niveles en suero de triglicérido, colesterol, y ácido graso libre (FFA) en ayuno en ratones tipo nativo en varios puntos de tiempo después de la inyección con una construcción de adenovirus que sobreexpresa el ANGPTL4 de ratón de longitud total, como se describe en el Ejemplo B.1.

[016] La Figura 2 muestra los niveles en suero de triglicérido en ayuno en ratones del tipo nativo tres días después de la inyección con una construcción de adenovirus (Ad5-mAngptl-4T) que expresa el ANGPTL4 de ratón de longitud total, como se describe en el Ejemplo B.1.

[017] La Figura 3 muestra los niveles en suero de colesterol en ayuno en ratones tipo nativo tres días después de la inyección con una construcción de adenovirus (Ad5-mAngptl-4T) que expresa ANGPTL4 de ratón de longitud total, como se describe en el Ejemplo B.1.

[018] La Figura 4 muestra los niveles en suero de triglicérido en ayuno en ratones tipo nativo cuatro días después de la inyección con una

construcción de adenovirus (Ad5-mAngptl-4T) que expresa ANGPTL4 humano de longitud total, como se describe en el Ejemplo B.2.

[019] La Figura 5 muestra los niveles en suero de colesterol en ayuno en ratones tipo nativo cuatro días después de la inyección con una construcción de adenovirus (Ad5-mAngptl-4T) que expresa ANGPTL4 humano de longitud total, como se describe en el Ejemplo B.2.

[020] La Figura 6 muestra los niveles en suero de triglicérido, colesterol, y ácido graso libre (FFA) en ratones tipo nativo (WT) y ratones con Angptl4 eliminada (HOM) sometidos a varias condiciones de dieta, como se describe en el Ejemplo C.

[021] La Figura 7 muestra el peso corporal y grasa corporal de ratones tipo nativo (WT) y ratones con Angptl4 eliminada (HOM) alimentados con una dieta estándar ("chow") o dieta alta en grasa (HFD), como se describe en el Ejemplo C.

[022] La Figura 8 muestra los niveles de la actividad de lipoproteína lipase endógena (LPL) en ratones tipo nativo (WT) y con Angptl4 aliminada (HOM) en los estados de alimentados y en ayuno, como se describe en el Ejemplo D.

[023] La Figura 9A muestra los niveles de lípido en los hígados de ratones tipo nativo (WT) y ratones con Angptl4 eliminada (HOM) alimentados con una dieta estándar ("chow") o una dieta alta en grasa (HFD). La Figura 9B muestra la tinción histoquímica de secciones de hígado de ratones tipo nativo (WT) y ratones con Angptl4 eliminada (HOM) alimentados con una dieta estándar ("chow") o una dieta alta en grasa (HFD), como se describe en el Ejemplo E.

[024] La Figura 10 muestra el contenido de lípido intracelular de ratones tipo nativo (WT) y con Angptl4 eliminada (HOM) alimentados con una dieta alta en grasa (HFD), como se describe en el Ejemplo E.

[025] La Figura 11, los paneles A y B, muestran los niveles de glucosa e insulina en ratones tipo nativo (WT) y con Angptl4 eliminada (HOM)

alimentados con una dieta estándar ("chow") o dieta alta en grasa (HFD), como se describe en el Ejemplo F. Los paneles C y D muestran la tolerancia a la glucosa y insulina en ratones tipo nativo (WT) y carentes (knockout) de Angptl4 (HOM) alimentados con una dieta alta en grasa (HFD).

[026] La Figura 12 muestra los niveles en suero de triglicérido en ayuno en ratones carentes (knockout) de Angptl4 tres días después de la inyección con una construcción de adenovirus (Ad5-mAngptl-4T) que expresa ANGPTL4 de ratón de longitud total, como se describe en el Ejemplo G.

[027] La Figura 13 muestra los niveles en suero de colesterol en ayuno de ratones carentes (knockout) de Angptl4 tres días después de la inyección con una construcción de adenovirus (Ad5-mAngptl-4T) que expresa ANGPTL4 de ratón de longitud total, como se describe en el Ejemplo G.

[028] La Figura 14 muestra la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) *in vitro* en la presencia de cantidades en aumento de ANGPTL4 de ratón de longitud total, como se describe en el Ejemplo I.

[029] La Figura 15 muestra ciertos anticuerpos monoclonales neutralizantes contra ANGPTL4 de ratón (4A8, 14D12, y 15F2) que recuperaron la actividad de LPL de la inhibición por ANGPTL4 *in vitro*, como se describe en el Ejemplo L.

[030] La Figura 16 muestra los resultados de experimentos de enlace a epítipo para los anticuerpos monoclonales 4A8, 14D12, y 15F2, como se describe en el Ejemplo O.

[031] La Figura 17 muestra los niveles en suero de triglicérido en ayuno en ratones tipo nativo alimentados con una dieta estándar cuatro días después de la inyección de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 de ratón, como se describe en el Ejemplo P.

[032] La Figura 18 muestra los niveles en suero de colesterol en ayuno en ratones tipo nativo alimentados con una dieta estándar cuatro días después de la inyección de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 de ratón, como se describe en el Ejemplo P.

[033] La Figura 19 muestra los niveles en suero de ácido graso libre en ayuno (FFA) en ratones tipo nativo alimentados con una dieta estándar cuatro días después de la inyección de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 de ratón, como se describe en el Ejemplo P.

[034] La Figura 20 muestra los niveles en suero de triglicérido en ayuno en ratones tipo nativo alimentados con una dieta alta en grasa cuatro días después de la inyección de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 de ratón, como se describe en el Ejemplo P.

[035] La Figura 21 muestra los niveles en suero de colesterol en ayuno en ratones tipo nativo alimentados con una dieta alta en grasa cuatro días después de la inyección de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 de ratón, como se describe en el Ejemplo P.

[036] La Figura 22 muestra los niveles en suero de triglicérido en ayuno en ratones tipo nativo alimentados con una dieta alta en grasa después de una sola inyección de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 de ratón y después de inyección semanal de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 de ratón por cinco semanas, como se describe en el Ejemplo P.

[037] La Figura 23 muestra los niveles en suero de colesterol en ayuno en ratones tipo nativo alimentados con una dieta alta en grasa después de una sola inyección de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 de ratón y después de inyección semanal de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 de ratón por cinco semanas, como se describe en el Ejemplo P.

[038] La Figura 24 muestra los niveles en suero de cuerpos cetónicos en ayuno en ratones tipo nativo alimentados con una dieta alta en grasa (HFD) después de inyección semanal de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 de ratón por cinco semanas, como se describe en el Ejemplo P.

[039] La Figura 25 muestra los niveles en suero en ayuno de triglicérido, colesterol total, lipoproteína de alta densidad (HDL), y lipoproteína de baja densidad (LDL) en ratones machos tipo nativo ("WT"), heterocigótico ("het"), y carentes (knockout) ("hom") (panel A) y ratones hembra tipo nativo

("WT") y carentes (knockout) ("hom") (panel B) alimentados con una dieta estándar ("chow"), como se describe en el Ejemplo C.

[040] La Figura 26 muestra los niveles en suero en ayuno de triglicérido, colesterol total, lipoproteína de alta densidad (HDL), y lipoproteína de baja densidad (LDL) en ratones de tipo nativo ("WT") y carentes (knockout) ("hom") alimentados con una dieta alta en grasa (HFD), como se describe en el Ejemplo C.

[041] La Figura 27 muestra los gramos de grasa corporal en ratones macho de tipo nativo ("WT") y carentes (knockout) de ANGPTL4 ("Hom") (panel A) y ratones hembra (panel B) alimentados con una dieta alta en grasa, como se describe en el Ejemplo C.

[042] La Figura 28 muestra la ingesta de alimento (panel A) y el porcentaje de grasa fecal fat (panel B) en ratones tipo nativo ("WT") y carentes (knockout) de ANGPTL4 ("Hom") alimentados con una dieta alta en grasa, como se describe en el Ejemplo C.

[043] La Figura 29 muestra el número de crías de ratón de tipo nativo, heterocigótico, y carentes (knockout) nacidos cruzados de padres heterocigóticos, como se discute en el Ejemplo C.

[044] La Figura 30 muestra la supervivencia de ratones de tipo nativo, y carentes (knockout) alimentados con una dieta alta en grasa (HFD), como se discute en el Ejemplo C.

[045] La Figura 31 muestra los niveles en suero de triglicérido en ayuno en ratones tipo nativo inyectados con anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4, como se describe en el Ejemplo R.

[046] La Figura 32 muestra los niveles en suero de colesterol total en ayuno en ratones tipo nativo inyectados con anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4, como se describe en el Ejemplo R.

[047] La Figura 33 muestra la afinidad de enlace relativa de los anticuerpos monoclonales 14D12, 15F2, y 90B4 para N-mANGPTL4 (panel A) y N-hANGPTL4 (panel B), como se describe en el Ejemplo S.

[048] La Figura 34 muestra la reducción porcentual de triglicéridos suero en ayuno en ratones tipo nativo en el día 4 (panel A) y el día 7 (panel B) después de la inyección con cualquiera de 14D12 o anti-KLH, como se describe en el Ejemplo T.

[049] La Figura 35, panel A, muestra una gráfica de la concentración de 14D12 y los niveles en suero de triglicérido en ayuno en ratones tipo nativo en el tiempo, después de una sola inyección de 14D12, como se describe en el Ejemplo U. El Panel B muestra una gráfica de la concentración de 14D12 y los niveles de colesterol total en ayuno en ratones tipo nativo en el tiempo, después de una sola inyección de 14D12, como se describe en el Ejemplo U.

[050] La Figura 36 muestra los niveles en suero de triglicérido en ayuno en ratones que sobreexpresan ANGPTL4 humana por cuatro días después de la inyección con el anticuerpo monoclonal anti-KLH, 14D12, 15F2, o 90B4, como se describe en el Ejemplo V.

[051] La Figura 37 muestra los niveles de colesterol total en ayuno en ratones que sobreexpresan ANGPTL4 humano cuatro días después de la inyección con el anticuerpo monoclonal anti-KLH, 14D12, 15F2, o 90B4, como se describe en el Ejemplo V.

[052] La Figura 38 muestra los niveles en suero de triglicérido en ayuno en ratones carentes (knockout) de LDLr después de quince inyecciones semanales con vehículo, anti-KLH, o 14D12, como se discute en el Ejemplo W.

[053] La Figura 39 muestra los niveles de colesterol total en ayuno en ratones carentes (knockout) de LDLr después de quine inyecciones semanales con vehículo, anti-KLH, o 14D12, como se discute en el Ejemplo W.

[054] La Figura 40 muestra los niveles en suero de triglicérido en ayuno en ratones carentes (knockout) de ApoE después de quince inyecciones semanales con vehículo, anti-KLH, o 14D12, como se discute en el Ejemplo X.

[055] La Figura 41 muestra los niveles de colesterol total en ayuno en ratones carentes (knockout) de ApoE después de quince inyecciones semanales con vehículo, anti-KLH, o 14D12, como se discute en el Ejemplo X.

[056] La Figura 42 muestra los niveles en suero de triglicérido en ayuno en ratones carentes (knockout) de LDLr cuatro días después de una sola inyección con anti-KLH o 14D12, como se discute en el Ejemplo W.

[057] La Figura 43 muestra los niveles de colesterol total en ayuno en ratones carentes (knockout) de LDLr cuatro días después de una sola inyección con anti-KLH o 14D12, como se discute en el Ejemplo W.

[058] La Figura 44 muestra los niveles en suero de triglicérido en ayuno en ratones carentes (knockout) de ApoE cuatro días después de una sola inyección con anti-KLH o 14D12, como se discute en el Ejemplo X.

[059] La Figura 45 muestra los niveles de colesterol total en ayuno en ratones carentes (knockout) de ApoE cuatro días después de una sola inyección con anti-KLH o 14D12, como se discute en el Ejemplo X.

[060] La Figura 46, panel A muestra los triglicéridos en suero en ayuno en ratones db/db antes y una semana después de la inyección con anti-KLH (Grp-1) y 14D12 (Grp-2), como se describe en el Ejemplo Y. El Panel B muestra los triglicéridos en suero en ratones db/db después de 8 inyecciones semanales con anti-KLH o 14D12, como se discute en el Ejemplo Y.

[061] La Figura 47 muestra una alineación de las regiones variables de la cadena pesada de 14D12 (SEQ ID NO: 12), 15F2 (SEQ ID NO: 13), y 90B4 (SEQ ID NO: 14), como se describe en el Ejemplo Z. La secuencia de consenso (SEQ ID NO: 15) también se muestra. La homología en porcentaje entre cada par de regiones variables de cadena pesada se muestra a continuación.

[062] La Figura 48 muestra una alineación de las regiones variables de cadena ligera de 14D12 (SEQ ID NO: 16), 15F2 (SEQ ID NO: 17), y 90B4 (SEQ ID NO: 18), como se describe en el Ejemplo Z. La secuencia de consenso

(SEQ ID NO: 19) también se muestra. La homología en porcentaje entre cada par de regiones variables de cadena ligera se muestra a continuación.

[063] La Figura 49 muestra el enlace de ciertos anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 a fragmentos de ANGPTL4, como se discute en el Ejemplo AA.

V. DESCRIPCION DETALLADA DE VARIAS REALIZACIONES

[064] Se entenderá que la descripción general anterior y la descripción detallada siguiente son ejemplares y explicativas solamente y no son restrictivas de la invención, como se reivindicaron.

[065] En esta solicitud, el uso de singular incluye el plural a menos que se declare específicamente de otra forma. En esta solicitud, la palabra “un” o “uno” significa “al menos uno” a menos que se declare específicamente de otra forma. En esta solicitud, el uso de “o” significa “y/o” a menos que se declare de otra forma. Adicionalmente, el uso del término “que incluye”, así como otras formas tales como “incluye” e “incluido”, no es limitante. Además, los terminus tales como “elemento” o “componente” abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos o componentes que comprenden más de una unidad, a menos que se declare específicamente de otra forma.

[066] La sección de encabezados usada aquí es para propósitos organizacionales solamente y no debe interpretarse como limitante de la material objeto descrita. Todos los documentos, o porciones de documentos, citados en esta solicitud, incluyendo pero sin limitarse a patentes, solicitudes de patente, artículos, libros, y tratados están por medio de la presente incorporados expresamente por referencia en su totalidad para cualquier propósito. En el caso que una o más de la literatura incorporada y materiales similares definan un término que se contradice con la definición de ese término en esta solicitud, la solicitud registrará.

A. Ciertas definiciones

[067] Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína" se usan intercambiabilmente aquí para referirse a un polímero de residuos de amino ácido. Los términos aplican a polímeros de amino ácido que contienen amino ácidos que se encuentran naturalmente así como polímeros de amino ácido en los cuales uno o más residuos de amino ácido son un análogo químico de un amino ácido que se encuentra naturalmente. Los polímeros de amino ácido pueden ser de cualquier longitud.

[068] El término "anticuerpo", como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo intacto o un fragmento de un anticuerpo que compite con el anticuerpo intacto para el enlace a antígeno. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, diacuerpos, y otros fragmentos de anticuerpo que retienen al menos una porción de la región variable de un anticuerpo intacto. Ver, p.e., Hudson et al. (2003) Nature Med. 9:129-134. En ciertas realizaciones, los fragmentos de anticuerpo se producen mediante clivado enzimático o químico de anticuerpos intactos. En ciertas realizaciones, los fragmentos de anticuerpo se producen mediante técnicas de ADN recombinantes.

[069] El término "polipéptido nativo" se refiere a un polipéptido que se encuentra naturalmente. El término "anticuerpo nativo" se refiere a un anticuerpo que se encuentra naturalmente.

[070] El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo de una población substancialmente homogénea de anticuerpos que se enlazan específicamente al mismo epítipo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal es secretado por un hibridoma. En tales ciertas realizaciones, un hibridoma es producido de acuerdo con ciertos métodos conocidos por los expertos en la técnica. Ver, p.e., Kohler y Milstein (1975) Nature, 256: 495-499). En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal es producir usando métodos de ADN recombinante (ver, p.e., Patente U.S. No. 4,816,567). En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal se refiere a un fragmento de anticuerpo aislado de una genoteca de despliegue del fago (ver, p.e., Clackson et al. (1991) Nature 352: 624-628, y Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597). Para otras técnicas de producción de anticuerpo monoclonal

diferentes, ver, p.e., Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[071] Un anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo preparado de componentes de al menos dos fuentes diferentes. En ciertas realizaciones, un anticuerpo quimérico comprende una porción de un anticuerpo derivada de una primera especie fusionada a otra molécula, p.e., una porción de un anticuerpo derivado de una segunda especie. En tales ciertas realizaciones, un anticuerpo quimérico comprende una porción de un anticuerpo derivado de un animal no humano fusionada a una porción de un anticuerpo derivado de un humano. En tales ciertas realizaciones, un anticuerpo quimérico comprende toda o una porción de una región variable de un anticuerpo derivado de un animal no humano fusionada a una región constante de un anticuerpo derivado de un humano.

[072] Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo no humano que ha sido modificado de forma que coincide más cercanamente (en secuencia de amino ácido) a un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado es entonces un tipo de anticuerpo quimérico. En ciertas realizaciones, los residuos de amino ácido fuera de los residuos de enlace a antígeno de la región variable del anticuerpo no humano son modificados. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado se construye reemplazando toda o una porción de una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo humano con toda o una porción de una CDR de otro anticuerpo, tal como un anticuerpo no humano, que tiene la especificidad de enlace a antígeno. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprende regiones variables en las cuales todas o substancialmente todas las CDRs corresponden a las CDRs de un anticuerpo no humano y todas o sustancialmente todas las regiones de marco (FRs) corresponden a las FRs de un anticuerpo humano. En tales ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprende además una región constante (Fc) de un anticuerpo humano.

[073] El término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo monoclonal que contiene secuencias de anticuerpo humano y no contiene secuencias de anticuerpo de un animal no humano. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humano puede contener secuencias sintéticas no encontradas

en los anticuerpos nativos. El término no está limitado por la forma en que se preparan los anticuerpos. Por ejemplo, en varias realizaciones, un anticuerpo humano puede prepararse en un ratón transgénico, mediante despliegue del fago, mediante linfocitos B humanos, o mediante métodos recombinantes.

[074] El término "anticuerpo neutralizante" o "anticuerpo que neutraliza" se refiere a un anticuerpo que reduce al menos una actividad de un polipéptido que comprende el epítipo al cual el anticuerpo se enlaza específicamente. En ciertas realizaciones, un anticuerpo neutralizante reduce una actividad *in vitro* y/o *in vivo*.

[075] El término "sitio de enlace a antígeno" se refiere a una porción de un anticuerpo capaz de enlazarse específicamente a un antígeno. En ciertas realizaciones, se provee un sitio de enlace a antígeno por una o más regiones variables de anticuerpo.

[076] El término "epítipo" se refiere a cualquier determinante de anticuerpo capaz de enlazarse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de célula T. En ciertas realizaciones, un epítipo es una región de un antígeno que está específicamente enlazada por un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un epítipo puede incluir agrupaciones de superficie químicamente activa de moléculas tales como amino ácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo, o sulfonilo. En ciertas realizaciones, un epítipo puede tener características estructurales tridimensionales específicas (p.e., un epítipo "conformacional") y/o características de carga específicas.

[077] Un epítipo es definido como "el mismo" que otro epítipo si un anticuerpo particular se enlaza específicamente a ambos epítipos. En ciertas realizaciones, los polipéptidos que tienen diferentes secuencias de amino ácido primarias pueden comprender epítipos que son los mismos. En ciertas realizaciones, los epítipos que son los mismos pueden tener secuencias de amino ácido primarias diferentes. Se dice que los anticuerpos diferentes se enlazan al mismo epítipo si compiten para enlace específico a ese epítipo.

[078] Un anticuerpo "se enlaza específicamente" a un antígeno cuando reconoce preferiblemente el antígeno en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En ciertas realizaciones, un anticuerpo comprende un sitio de

enlace a antígeno que se enlaza específicamente a un epítipo particular. En tales ciertas realizaciones, el anticuerpo es capaz de enlazar diferentes antígenos siempre que los antígenos diferentes comprendan ese epítipo particular. En ciertas instancias, por ejemplo, las proteínas homólogas de diferentes especies pueden comprender el mismo epítipo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se enlaza específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación (K_D) es $\leq 1 \mu\text{M}$, en ciertas realizaciones, cuando la constante de disociación es $\leq 100 \text{ nM}$, y en ciertas realizaciones, cuando la constante de disociación es $\leq 10 \text{ nM}$.

[079] El término "ANGPTL4" se refiere a una proteína 4 del tipo angiopoyetina de cualquier fuente vertebrada o mamífera, incluyendo, pero sin limitarse a, humana, bovina, de pollo, roedor, ratón, rata, porcino, ovino, primate, mono, y conejillo de indias, a menos que se especifique de otra forma. El término también se refiere a fragmentos y variantes de ANGPTL4 nativa que mantiene al menos una actividad *in vivo* o *in vitro* de una ANGPTL4 nativa. El término abarca formas precursoras no procesadas de longitud total de ANGPTL4 así como formas maduras resultantes de clivado post-translacional de los péptidos de señal y formas resultantes del procesamiento proteolítico del dominio de fibrinógeno. En ciertas realizaciones, una ANGPTL4 de ratón no procesada, de longitud total, tiene la secuencia de amino ácido indicada en la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, una ANGPTL4 de ratón no procesada, de longitud total, tiene la secuencia de amino ácido indicada en la SEQ ID NO: 50. En ciertas realizaciones, una ANGPTL4 humana no procesada, de longitud total, tiene la secuencia de amino ácido indicada en la SEQ ID NO:2.

[080] El término "Angptl4" se refiere a un ácido nucleico que codifica la ANGPTL4.

[081] El término "LPL" se refiere a una lipoproteína lipasa de cualquier fuente vertebrada o mamífera, incluyendo, pero sin limitarse a, humana, bovina, de pollo, roedor, ratón, rata, porcina, ovina, primate, de mono, y conejillo de indias. En ciertas realizaciones, una lipoproteína lipasa cataliza la hidrólisis de triacilglicerol en quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs) en diacilglicerol y un anión de ácido graso libre. En ciertas realizaciones, una lipoproteína lipasa también es capaz de hidrolizar diacilglicerol.

[082] El término "agente" se refiere a un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto preparado de materiales biológicos.

[083] El término "antagonista" se refiere a un agente que reduce una actividad de ANGPTL4.

[084] El término "agonista" se refiere a un agente que aumenta una actividad de ANGPTL4.

[085] El término "paciente" incluye sujetos humanos y animales. En ciertas realizaciones, un paciente es un mamífero. En tales ciertas realizaciones, un paciente es un humano.

[086] Un "fragmento" de un polipéptido de referencia se refiere a un tramo contiguo de amino ácidos de cualquier porción del polipéptido de referencia. Un fragmento puede ser de cualquier longitud que sea menor que la longitud del polipéptido de referencia.

[087] Un "variante" de un polipéptido de referencia a un polipéptido que tiene una o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de amino ácido, con relación al polipéptido de referencia.

[088] Una sustitución de amino ácido "conservadora" se refiere a la sustitución de un amino ácido en un polipéptido con otro amino ácido que tiene propiedades similares, tales como tamaño o carga. En ciertas realizaciones, un polipéptido que comprende una sustitución de amino ácido conservadora mantiene al menos una actividad del polipéptido no sustituido. Una sustitución de amino ácido conservadora puede abarcar residuos de amino ácido que no se encuentran naturalmente, que son típicamente incorporados mediante síntesis química de péptido en lugar de síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen, pero no se limitan a, peptidomiméticos y otras formas inversas o invertidas de mitades de amino ácido.

[089] Los residuos que se encuentran naturalmente se pueden dividir en clases con base en propiedades de cadena lateral comunes:

- 1) hidrofóbicos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) hidrofílicos neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 3) ácidos: Asp, Glu;
- 4) básicos: His, Lys, Arg;
- 5) residuos que influencian la orientación de cadena: Gly, Pro; y
- 6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

[090] Por ejemplo, las sustituciones no conservadoras pueden involucrar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Tales residuos sustituidos pueden ser introducidos en regiones de un anticuerpo humano que son homólogas con anticuerpos no humanos, o en las regiones no homólogas de la molécula.

[091] En la preparación de las sustituciones, de acuerdo con ciertas realizaciones, se puede considerar el índice hidropático de los amino ácidos. A cada amino ácido se le ha asignado un índice hidropático con base en su hidrofobicidad y las características de cambio. Estos son: isoleucina (+4.5); valina (+4.2); leucina (+3.8); fenilalanina (+2.8); cisteína/cistina (+2.5); metionina (+1.9); alanina (+1.8); glicina (-0.4); treonina (-0.7); serina (-0.8); triptofan (-0.9); tirosina (-1.3); prolina (-1.6); histidina (-3.2); glutamato (-3.5); glutamina (-3.5); aspartato (-3.5); asparagina (-3.5); lisina (-3.9); y arginina (-4.5).

[092] La importancia del índice hidropático de amino ácido para conferir la función biológica interactiva de una proteína, en ciertas instancias, es entendida en la técnica. Kyte *et al.*, J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982). Se conoce que en ciertas instancias, ciertos amino ácidos pueden ser sustituidos por otros amino ácidos que tienen un índice o puntaje hidropático similar y aún retienen una actividad biológica similar. Al hacer cambios con base en el índice hidropático, en ciertas realizaciones, se incluye la sustitución de amino ácidos cuyos índices hidropáticos están entre ± 2 . En ciertas realizaciones, se incluyen aquellos que están entre ± 1 , y en ciertas realizaciones, se incluyen aquellos que están entre ± 0.5 .

[093] También se entiende en la técnica que la sustitución de amino ácidos similares se puede hacer efectivamente con base en la hidrofili­cidad, particularmente cuando la proteína o péptido biológicamente funcional creada de esta forma está destinada para uso en realizaciones inmunológicas, como en el caso presente. En ciertas realizaciones, la mayor hidrofili­cidad promedio local de una proteína, regulada por la hidrofili­cidad de sus amino ácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, p.e., con una propiedad biológica de la proteína.

[094] Los siguientes valores de hidrofili­cidad se han asignado a estos residuos de amino ácido: arginina (+3.0); lisina (+3.0); aspartato (+3.0 ± 1); glutamato (+3.0 ± 1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina (-0.4); prolina (-0.5 ± 1); alanina (-0.5); histidina (-0.5); cisteína (-1.0); metionina (-1.3); valina (-1.5); leucina (-1.8); isoleucina (-1.8); tirosina (-2.3); fenilalanina (-2.5) y triptofan (-3.4). Al hacer cambios con base en los valores de hidrofili­cidad similar, en ciertas realizaciones, se incluye la sustitución de amino ácidos cuyos valores de hidrofili­cidad están entre ±2, en ciertas realizaciones, se incluyen aquellos que están entre ±1, y en ciertas realizaciones, se incluyen aquellos entre ±0.5. También se pueden identificar epítomos de secuencias de amino ácido primarias con base en la hidrofili­cidad. Estas regiones también son referidas como "regiones de núcleo epitópico".

[095] Sustituciones de amino ácido ejemplares se indican en la Tabla 1.

Tabla 1: Sustituciones de Amino Ácido

Residuo Original	Sustituciones Ejemplares
Ala	Val, Leu, Ile
Arg	Lys, Gln, Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro, Ala

His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg, ácido 1,4 Diamino- butírico, Gln, Asn
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr, Ala, Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina

[096] Un experto promedio sera capaz de determinar variantes adecuados de un polipéptido como se indica aquí usando técnicas bien conocidas. En ciertas realizaciones, un experto en la técnica puede identificar areas adecuadas de la molécula que pueden ser cambiadas sin desctruir la actividad mediante el direccionamiento de regiones que no se cree que sean importantes para la actividad. En ciertas realizaciones, se pueden identificar residuos y porciones de las moléculas que son conservadas entre polipéptidos similares. En ciertas realizaciones, incluso areas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden ser cometivas a sustituciones conservadoras de amino ácido sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente la estructura del polipéptido.

[097] Adicionalmente, en ciertas realizaciones, un experto en la técnica puede revisar los estudios de estructura-función que identifican los residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o estructura. En vista de tal comparación, en ciertas realizaciones, se puede predecir la importancia de residuos de amino ácido en una proteína que corresponde a los

64

residuos de amino ácido que son importantes para la actividad o estructura en proteínas similares. En ciertas realizaciones, un experto en la técnica puede optar por sustituciones de amino ácido químicamente similares para tales residuos de amino ácido importantes predichos.

[098] En ciertas realizaciones, un experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de amino ácido en relación con esta estructura en polipéptidos similares. En ciertas realizaciones, en vista de tal información, un experto en la técnica puede predecir la alineación de los residuos de amino ácido de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. En ciertas realizaciones, un experto en la técnica puede elegir no hacer cambios radicales a los residuos de amino ácido predichos para estar en la superficie de la proteína, porque tales residuos pueden estar involucrados en interacciones importantes con otras moléculas. Más aún, en ciertas realizaciones, el experto en la técnica puede generar variantes de prueba que contienen una sola sustitución de amino ácido en cada residuo de amino ácido deseado. En ciertas realizaciones, los variantes pueden entonces ser detectados usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, tales variantes se podrían usar para reunir información acerca de variantes adecuados. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, si se descubre que un cambio a un residuo de amino ácido particular produjo actividad destruida, indeseablemente reducida, o variantes no adecuados, los variantes con tales cambios pueden ser evitados. En otras palabras, en ciertas realizaciones, con base en la información reunida de los experimentos de rutina, el experto en la técnica puede fácilmente determinar los amino ácidos en donde se deben evitar sustituciones adicionales ya sea solas o en combinación con otras mutaciones.

[099] Un número de publicaciones científicas se han dedicado a la predicción de estructura secundaria. Ver, p.e., Moulton J., Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427 (1996), Chou *et al.*, Biochemistry, 13(2):222-245 (1974); Chou *et al.*, Biochemistry, 113(2):211-222 (1974); Chou *et al.*, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148 (1978); Chou *et al.*, Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 y Chou *et al.*, Biophys. J., 26:367-384 (1979). Más aún, programas de computadora están actualmente disponibles para ayudar a predecir la estructura secundaria. Un método para predecir la estructura secundaria se basa en el modelamiento de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o

proteínas que tienen una identidad de secuencia de más del 30%, o en forma de más del 40%, usualmente tienen topologías estructurales similares. El crecimiento de la base de datos estructural de proteína (PDB) ha proporcionado predicción mejorada de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de pliegues dentro de una estructura de polipéptido. Ver, *p.e.*, Holm *et al.*, Nucl. Ácido. Res., 27(1):244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner *et al.*, Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376 (1997)) que hay un número limitado de pliegues en un polipéptido o proteína dada, y que una vez se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural se volverá dramáticamente más precisa.

[0100] Métodos adicionales para predecir la estructura secundaria incluyen "hilvanado" (*ver, p.e.*, Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87 (1997); Sippl *et al.*, Structure, 4(1):15-19 (1996)), "análisis de perfil" (*ver, p.e.*, Bowie *et al.*, Science, 253:164-170 (1991); Gribskov *et al.*, Meth. Enzym., 183:146-159 (1990); Gribskov *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358 (1987)), y "enlace evolucionario" (*ver, p.e.*, Holm *et al.*, Nucl. Ácido. Res., 27(1):244-247 (1999), y Brenner *et al.*, Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376 (1997)).

[0101] En ciertas realizaciones, un variante de un anticuerpo de referencia incluye un variante de glicosilación en donde el número y/o tipo de sitios de glicosilación han sido alterados con relación a la secuencia de amino ácido del anticuerpo de referencia. En ciertas realizaciones, un variante de un polipéptido comprende un número mayor o menor de sitios de glicosilación enlazados a N con relación a un polipéptido nativo. Un sitio de glicosilación enlazado a N está caracterizado por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en donde el residuo de amino ácido designado como X puede ser cualquier amino excepto prolina. La sustitución de residuos de amino ácido para crear esta secuencia provee un nuevo sitio potencial para la adición de una cadena de carbohidrato enlazada a N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan esta secuencia removerá una cadena de carbohidrato enlazada a N. En ciertas realizaciones, se provee un reordenamiento de cadenas de carbohidrato enlazadas a N, en donde uno o más sitios de glicosilación enlazados a N (típicamente aquellos que se encuentran naturalmente) son eliminados, y uno o más sitios enlazados a N son creados. Variantes de anticuerpo ejemplares incluyen variantes de cisteína, en donde uno o más residuos de cisteína son

eliminados o sustituidos por otro amino ácido (p.e., serina) con relación a la secuencia de amino ácido del anticuerpo de referencia. En ciertas realizaciones, los variantes de cisteína pueden ser útiles cuando los anticuerpos deben ser replegados en una conformación biológicamente activa tal como después del aislamiento de cuerpos de inclusión insoluble. En ciertas realizaciones, los variantes de cisteína tienen menores residuos de cisteína que un polipéptido nativo. En ciertas realizaciones, los variantes de cisteína tienen un número par de residuos de cisteína para minimizar las interacciones resultantes de cisternas no pares.

[0102] De acuerdo con ciertas realizaciones, las sustituciones de amino ácido son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de enlace para formar complejos de proteína, (4) alteran las afinidades de enlace, y/o (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales en tales polipéptidos. De acuerdo con ciertas realizaciones, las sustituciones simples o múltiples de amino ácido (en ciertas realizaciones, sustituciones de amino ácido conservadoras) se pueden hacer en una secuencia que se encuentra naturalmente (en ciertas realizaciones, en la porción del polipéptido fuera de dominio(s) que forman contactos intermoleculares). En ciertas realizaciones, una sustitución de amino ácido conservadora puede típicamente no cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia de referencia (p.e., en ciertas realizaciones, un reemplazo de amino ácido no debe tender a romper una hélice que se encuentra en la secuencia de referencia, o interrumpir otros tipos de estructuras secundarias que caracterizan la secuencia de referencia). Ejemplos de ciertas estructuras secundarias y terciarias de polipéptido reconocidas en la técnica se describen, por ejemplo, en Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman y Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991).

[0103] La "identidad porcentual" o "% de identidad", con referencia a las secuencias de ácido nucleico, se refiere al porcentaje de nucleótidos idénticos entre al menos dos secuencias de polinucleótido alineadas usando el motor Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (herramienta de Búsqueda De Alineación Local Básica). Ver Tatusova et al. (1999) FEMS Microbiol Lett.

174:247-250. El motor BLAST (versión 2.2.10) es proporcionado al público por el National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD. Para alinear dos secuencias de polinucleótido, se usa la herramienta "Secuencias Blast 2", que emplea el programa "blastn" con parámetros ajustados como valores por defecto de la siguiente forma:

Matriz: no aplicable

Retribución para coincidencia: 1

Penalidad para no coincidencia: -2

Espacio abierto: 5 penalidades

Espacio de extensión: 2 penalidades

Espacio _x caída: 50

Esperado: 10.0

Tamaño de palabra: 11

Filtro: encendido

[0104] "Identidad porcentual" o "% de identidad", con referencia a las secuencias de polipéptido, se refiere al porcentaje de amino ácidos idénticos entre al menos dos secuencias de polipéptido alineadas usando el motor Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Ver Tatusova et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250. El motor BLAST (versión 2.2.10) es proporcionado al público por el National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD. Para alinear dos secuencias de polipéptido, se usa la herramienta "Secuencias Blast 2", que emplea el programa "blastp" con parámetros ajustados en valores por defecto de la siguiente forma:

Matriz: BLOSUM62

Espacio abierto: 11 penalidades

Espacio de extensión: 1 penalidad

Espacio _x caída: 50

Esperado: 10.0

Tamaño de palabra: 3

Filtro: encendido

[0105] El término "dosis efectiva" o "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de un agente, p.e., un anticuerpo neutralizante, que produce la reducción de los síntomas en un paciente o produce un resultado biológico

deseado. En ciertas realizaciones, una dosis efectiva o cantidad efectiva es suficiente para reducir al menos una actividad de ANGPTL4. En ciertas realizaciones, una dosis efectiva o cantidad efectiva se determina como se describe a continuación, Parte V.G.

[0106] El término "tratamiento" abarca medidas terapéuticas y profilácticas/preventivas a menos que se indique de otra forma. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen, pero no se limitan a, individuos que ya tienen una condición o trastorno particular así como individuos que están en riesgo de adquirir una condición o trastorno particular (p.e., aquellos que necesitan medidas profilácticas/preventivas). El término "tratar" se refiere a administrar un agente a un paciente para propósitos terapéuticos y/o profilácticos/preventivos.

[0107] Un "agente terapéutico" se refiere a un agente que puede ser administrado *in vivo* para ocasionar un efecto terapéutico y/o profiláctico/preventivo.

[0108] Un "anticuerpo terapéutico" se refiere a un anticuerpo que puede ser administrado *in vivo* para ocasionar un efecto terapéutico y/o profiláctico/preventivo.

[0109] Los términos "ácido nucleico aislado" y "polinucleótido aislado" se usan intercambiamente y se refieren a un polinucleótido genómico, ADNc, u origen sintético o alguna combinación del mismo. Un "polinucleótido aislado" (1) no está asociado con toda o una porción de un polinucleótido en el cual el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está enlazado a un polinucleótido al cual no está enlazado en la naturaleza, o (3) no se encuentra en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

B. Estructura de anticuerpos nativos y ciertos fragmentos de anticuerpo

[0110] Un anticuerpo nativo tiene típicamente una estructura tetramérica. Un tetrámero comprende típicamente pares idénticos de cadenas de polipéptido, cada par tiene una cadena ligera (en ciertas realizaciones, aproximadamente 25 kDa) y una cadena pesada (en ciertas realizaciones,

aproximadamente 50-70 kDa). En un anticuerpo nativo, una cadena pesada comprende una región variable, V_H , y tres regiones constantes, C_{H1} , C_{H2} , y C_{H3} . El dominio V_H está en el terminal amino de la cadena pesada, y el dominio C_{H3} está en el terminal carboxi. En un anticuerpo nativo, una cadena ligera comprende una región variable, V_L , y una región constante, C_L . La región variable de la cadena ligera está en el terminal amino de la cadena ligera. En un anticuerpo nativo, las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forma típicamente el sitio de enlace a antígeno. Las regiones constantes son típicamente responsables de la función efectora.

[0111] Las cadenas ligeras humanas nativas son clasificadas típicamente como cadenas ligeras kapa y lambda. Las cadenas pesadas humanas nativas se clasifican típicamente como mu, delta, gama, alfa, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. El IgG tiene subclases, incluyendo, pero sin limitarse a, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. El IgM tiene subclases que incluyen, pero no se limitan a, IgM1 e IgM2. El IgA tiene subclases que incluyen, pero no se limitan a, IgA1 e IgA2. Dentro de las cadenas ligera y pesada humanas nativas, ñas regiones variables y constants están típicamente unidas mediante una región "J" de aproximadamente 12 o más amino ácidos, con la cadena pesada incluyendo también una región "D" de aproximadamente 10 amino ácidos más. Ver, *p.e.*, Fundamental Immunology (1989) ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y.).

[0112] En un anticuerpo nativo, las regiones variables exhiben típicamente la misma estructura general en la cual regiones de marco relativamente conservadas (FRs) están unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Las CDRs de las dos cadenas de cada par están típicamente alineadas por las regiones de marco, que pueden permitir el enlace a un epítopo específico. Del N-terminal al C-terminal, ambas regiones variables de cadena ligera y pesada comprenden típicamente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDRs en la cadena pesada son referidas como H1, H2, y H3, mientras las CDRs en la cadena ligera son referidas como L1, L2, y L3. Típicamente, la CDR3 es la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de enlace a antígeno. H3, por ejemplo, en ciertas instancias, puede ser tan corto como dos residuos de amino ácido o de más de 26. La asignación de

amino ácidos a cada dominio está típicamente de acuerdo con las definiciones de Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Publication No. 91-3242, vols. 1-3, Bethesda, MD); Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); o Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989). En la presente solicitud, el término "CDR" se refiere a una CDR de cadena ligera o pesada, a menos que se especifique de otra forma.

[0113] Un fragmento "Fab" comprende una cadena ligera y la C_{H1} y región variable de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace de disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un fragmento "Fab'" comprende una cadena ligera y una cadena pesada que comprende región constante adicional, que se extiende entre los dominios C_{H1} y C_{H2}. Un enlace de disulfuro de inter-cadena se puede formar entre dos cadenas pesadas de un fragmento Fab' para formar una molécula de "F(ab')₂".

[0114] Un fragmento "Fv" comprende las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, pero carece de las regiones constantes. Un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera conectados mediante un enlazante flexible para formar una cadena de polipéptido sencilla con una región de enlace a antígeno. Anticuerpos de cadena simple ejemplares se discuten en detalle en WO 88/01649 y las Patentes U.S. Nos. 4,946,778 y 5,260,203. En ciertas instancias, una región variable sencilla (una mitad de un Fv) puede tener la habilidad de reconocer y enlazar a antígeno, aunque con menor afinidad que el Fv.

[0115] Como se usa aquí, el término "cadena pesada" se refiere a un polipéptido que comprende secuencia de región variable de cadena pesada suficiente para conferir especificidad de antígeno ya sea sola o en combinación con una cadena ligera.

[0116] Como se usa aquí, el término "cadena ligera" se refiere a un polipéptido que comprende secuencia de región variable de cadena ligera suficiente para conferir especificidad de antígeno ya sea sola o en combinación con una cadena pesada.

C. Ciertos anticuerpos

[0117] En ciertas realizaciones, se proveen anticuerpos monoclonales que se enlazan específicamente a ANGPTL4. En tales ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonal son anticuerpos monoclonales neutralizantes que reducen al menos una actividad de ANGPTL4 *in vivo* y/o *in vitro*.

[0118] En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra ANGPTL4 recupera la actividad de LPL en la presencia de ANGPTL4 *in vitro*. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra ANGPTL4 reduce al menos un nivel de lípido en suero *in vivo*. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra ANGPTL4 reduce los niveles de triglicérido en suero *in vivo*. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante reduce los niveles de colesterol levels *in vivo*. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra ANGPTL4 reduce los niveles de ácido graso libre (FFA) *in vivo*.

[0119] En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra ANGPTL4 reduce los triglicéridos en suero en ratones carentes (knockout) de LDLr *in vivo*. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra ANGPTL4 reduce el colesterol total en ratones carentes (knockout) de LDLr *in vivo*. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra ANGPTL4 reduce los triglicéridos en suero en ratones carentes (knockout) de ApoE *in vivo*. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra ANGPTL4 reduce el colesterol total en ratones carentes (knockout) de ApoE *in vivo*. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra ANGPTL4 reduce los triglicéridos en suero en ratones db/db *in vivo*. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra ANGPTL4 reduce el colesterol total en ratones db/db *in vivo*.

[0120] En ciertas realizaciones, se proveen anticuerpos monoclonales neutralizantes que se enlazan específicamente a ANGPTL4 de ratón. En ciertas realizaciones, se proveen anticuerpos monoclonales neutralizantes que se enlazan específicamente a la ANGPTL4 humana. En ciertas realizaciones, se proveen anticuerpos monoclonales neutralizantes que se enlazan específicamente al mismo epítipo en ANGPTL4 de diferentes especies (p.e.,

anticuerpos que demuestran reactividad cruzada). En tales ciertas realizaciones, los anticuerpos se enlazan específicamente a ANGPTL4 de ratón y ANGPTL4 humano.

[0121] En ciertas realizaciones, se proveen anticuerpos monoclonales neutralizantes que se enlazan específicamente a un epítipo dentro del dominio de hélice enrollada N-terminal de ANGPTL4. En ciertas realizaciones, se proveen anticuerpos monoclonales neutralizantes que se enlazan específicamente a un epítipo dentro del dominio de hélice enrollada N-terminal de ANGPTL4 de ratón. En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales neutralizantes se enlazan específicamente a un epítipo dentro de una región de ANGPTL4 de ratón (SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 50) del residuo 21 al residuo 174. En ciertas realizaciones, se proveen anticuerpos monoclonales neutralizantes que se enlazan específicamente a un epítipo dentro del dominio de hélice enrollada N-terminal de ANGPTL4 humana. En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales neutralizantes se enlazan específicamente a un epítipo dentro de una región de ANGPTL4 humana (SEQ ID NO:2) del residuo 21 al residuo 169.

[0122] En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales neutralizantes son anticuerpos monoclonales no humanos. En tales ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales neutralizantes son anticuerpos monoclonales de roedor. En ciertas de tales realizaciones, los anticuerpos monoclonales neutralizantes son anticuerpos monoclonales de ratón. En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales neutralizantes son anticuerpos monoclonales quiméricos. En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales neutralizantes son anticuerpos monoclonales humanizados. En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales neutralizantes son anticuerpos monoclonales humanos. En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados, y/o humanos son útiles como anticuerpos terapéuticos en humanos.

[0123] En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales neutralizantes son fragmentos de anticuerpo. Fragmentos de anticuerpo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, diacuerpos, y otros fragmentos de anticuerpo.

[0124] Se proveen los anticuerpos monoclonales neutralizantes ejemplares, designados 14D12, 90B4, y 15F2,. Aquellos anticuerpos se enlazan a un epítipo dentro de los residuos 21 a 174 de ANGPTL4 de ratón (SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 50). Aquellos anticuerpos también neutralizan la actividad de ANGPTL4. Así, se esperaría que los anticuerpos que se enlazan al mismo epítipo (p.e., en ANGPTL4 humano o de ratón) también posean actividad neutralizante. Ciertos anticuerpos monoclonales neutralizantes contra ANGPTL4 se enlazan a uno o más péptidos elegidos de las SEQ ID NOs: 40 a 48. Ciertos anticuerpos monoclonales neutralizantes contra ANGPTL4 se enlazan a uno o más péptidos elegidos de las SEQ ID NOs: 40 a 43. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra ANGPTL4 se enlaza a un péptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 40. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra ANGPTL4 se enlaza a un péptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 41. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra ANGPTL4 se enlaza a un péptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 43. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra ANGPTL4 se enlaza tanto a un péptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 41 como a un péptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 43.

[0125] En ciertas realizaciones, se proveen anticuerpos monoclonales neutralizantes que se enlazan al mismo epítipo al cual se enlaza el anticuerpo monoclonal 14D12. En ciertas realizaciones, se proveen anticuerpos monoclonales neutralizantes que se enlazan al mismo epítipo al cual se enlaza el anticuerpo monoclonal 15F2. En ciertas realizaciones, se proveen anticuerpos monoclonales neutralizantes que se enlazan al mismo epítipo al cual se enlaza el anticuerpo monoclonal 90B4.

[0126] Ciertos anticuerpos neutralizantes comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 12. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 13. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 14. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 16. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena ligera

que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 17. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 18.

[0127] Ciertos anticuerpos neutraizantes comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 16. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprise una cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 17. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 18.

1. Anticuerpos monoclonales quimerizados y humanizados

[0128] En ciertas realizaciones, los anticuerpos no humanos son quimerizados. En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales de ratón que se enlazan específicamente a ANGPTL4 humana son quimerizados. Se proveen ciertos métodos ejemplares para preparar anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en Morrison et al. (1984) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Neuberger et al. (1984) Nature 312:604-608; Takeda et al. (1985) Nature 314:452-454; y las Patentes U.S. Nos. 6,075,181 y 5,877,397.

[0129] En ciertas realizaciones, los anticuerpos no humanos son "humanizados." En ciertas realizaciones, los anticuerpos monocloales de ratón que se enlazan específicamente a ANGPTL4 humano son humanizados. En ciertas realizaciones, anticuerpos monoclonales de ratón propagados contra ANGPTL4 de ratón, pero que se enlazan específicamente (p.e., reaccionan curzadamente) con ANGPTL4 humano, son humanizados. En ciertas realizaciones, los anticuerpos humanizados reitienen bu especificidad de enlace y tienen inmunogenicidad reducida (p.e., respuesta de anticuerpo anti-ratón humana reducida (HAMA)) cuando son administrados a un humano. En

ciertas realizaciones, la humanización se logra mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a, injerto de CDR e ingeniería humana, como se describe en detalle a continuación.

[0130] En ciertas realizaciones de los anticuerpos humanizados, una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo con la especificidad de enlace deseada (el anticuerpo "donador") son injertados en regiones de marco humanas (FRs) en un anticuerpo "aceptor". El injerto de CDR ejemplar se describe, p.e., en las Patentes U.S. Nos. 6,180,370, 5,693,762, 5,693,761, 5,585,089, y 5,530,101; Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033. En ciertas realizaciones, una o más CDRs de las regiones variables de cadena ligera y cadena son injertadas en FRs humanos de consenso en un anticuerpo aceptor. Para crear FRs humanos de consenso, en ciertas realizaciones, los FRs de varias secuencias de amino ácido de cadena pesada o cadena ligera humana están alineados para identificar una secuencia de amino ácido de consenso.

[0131] En ciertas realizaciones, ciertos amino ácidos de FR en el anticuerpo aceptor son reemplazados con amino ácidos de FR del anticuerpo donador. En ciertas de tales realizaciones, los amino ácidos de FR del anticuerpo donador son amino ácidos que contribuyen a la afinidad del anticuerpo donador para el antígeno objetivo. Ver, p.e., en las Patentes U.S. Nos. 6,180,370, 5,693,762, 5,693,761, 5,585,089, y 5,530,101; Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033. En ciertas realizaciones, se usan programas de computadora para modelar los anticuerpos donadores y/o aceptor para identificar residuos que probablemente están involucrados en el enlace a antígeno y/o contribuyen a la estructura del sitio de enlace a antígeno, ayudando así en la selección de residuos, tales como residuos de FR, a ser reemplazados en el anticuerpo donador.

[0132] En ciertas realizaciones, las CDRs de un anticuerpo donador son injertadas en un anticuerpo aceptor que comprende una región constante humana. En tales ciertas realizaciones, los FRs también son injertados en el aceptor. En ciertas realizaciones, las CDRs de un anticuerpo donador se derivan de un anticuerpo Fv de cadena sencilla. En ciertas realizaciones, los FRs de un anticuerpo donador se derivan de un anticuerpo Fv de cadena

sencilla. En ciertas realizaciones, las CDRs injertadas en un anticuerpo humanizado son modificadas adicionalmente (p.e., mediante sustituciones, eliminaciones o inserciones de amino ácido) para aumentar la afinidad del anticuerpo humanizado para el antígeno objetivo. En ciertas realizaciones, los FRs injertados en un anticuerpo humanizado son modificados adicionalmente (p.e., mediante sustituciones, eliminaciones o inserciones de amino ácido) para aumentar la afinidad del anticuerpo humanizado para el antígeno objetivo.

[0133] En ciertas realizaciones, los anticuerpos no humanos pueden ser humanizados usando un método de "ingeniería humana". Ver, p.e., las Patentes U.S. Nos. 5,766,886 y 5,869,619. En ciertas realizaciones de ingeniería humana, se usa la información sobre la estructura de los dominios variables de anticuerpo (p.e., información obtenida de estructuras de cristal y/o modelamiento molecular) para evaluar la probabilidad que un amino ácido dado en una región variable esté (a) involucrado en el enlace a antígeno, (b) expuesto en la superficie del anticuerpo (p.e., accesible al solvente), o (c) enterrado dentro de la región variable de anticuerpo (p.e., involucrado en el mantenimiento de la estructura de la región variable). Adicionalmente, en ciertas realizaciones, se generan secuencias de consenso de región variable humanas para identificar residuos que son conservados entre regiones variables humanas. En ciertas realizaciones, esa información provee guía en lo relacionado si un residuo de amino ácido en la región variable de un anticuerpo no humano debe ser sustituido.

[0134] Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena pesada que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3 de 14D12. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena pesada que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3 de 15F2. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena pesada que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3 de 90B4. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena pesada que comprende al menos una CDR de 14D12. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena pesada que comprende al menos una CDR de 15F2. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena pesada que comprende al menos una CDR de 90B4. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena pesada que comprende al menos dos CDRs de 14D12. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena pesada que comprende al menos dos CDRs de 15F2. Ciertos anticuerpos

neutralizantes comprenden una cadena pesada que comprende al menos dos CDRs de 90B4.

[0135] Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena ligera que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3 de 14D12. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena ligera que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3 de 15F2. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena ligera que comprende las CDR1, CDR2, y CDR3 de 90B4. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena ligera que comprende al menos una CDR de 14D12. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena ligera que comprende al menos una CDR de 15F2. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena ligera que comprende al menos un CDR de 90B4. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena ligera que comprende al menos dos CDRs de 14D12. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena ligera que comprende al menos dos CDRs de 15F2. Ciertos anticuerpos neutralizantes comprenden una cadena ligera que comprende al menos dos CDRs de 90B4.

2. Isotipos de anticuerpo

[0136] En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra ANGPTL4 es de cualquier isotipo seleccionado de IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE. En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra ANGPTL4 es del isotipo IgG. En tales ciertas realizaciones, un anticuerpo es de la subclase IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra ANGPTL4 es del isotipo IgM. En tales ciertas realizaciones, un anticuerpo es de la subclase IgM1 o IgM2. En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra ANGPTL4 es del isotipo IgA. En tales ciertas realizaciones, un anticuerpo es de la subclase IgA1 o IgA2. En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra ANGPTL4 comprende una cadena ligera kapa humana y una cadena pesada IgG1 o IgG2 humana. En ciertas realizaciones, un anticuerpo contra ANGPTL4 comprende una cadena ligera kapa de ratón y una cadena pesada IgG1 o IgG2 de ratón.

3. Anticuerpos modificados

[0137] En varias realizaciones, un anticuerpo es modificado para alterar una o más de sus propiedades. En ciertas realizaciones, un anticuerpo

modificado puede poseer ventajas sobre un anticuerpo no modificado, tales como estabilidad aumentada, tiempo en circulación aumentado, o inmunogenicidad disminuida (ver, p.e., la Patente U.S. No. 4,179,337). En ciertas realizaciones, un anticuerpo es modificado enlazándolo a una mitad no proteínica. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es modificado alterando el estado de glicosilación del anticuerpo, p.e., alterando el número, tipo, enlace, y/o posición de las cadenas de carbohidrato en el anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es alterado de forma que no está glicosilado.

[0138] En ciertas realizaciones, una o más mitades químicas están enlazadas a la estructura de amino ácido y/o residuos de carbohidrato del anticuerpo. Ciertos métodos ejemplares para la unión de una mitad química a un anticuerpo son conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, reacciones de acilación o reacciones de alquilación. Ver, por ejemplo, EP 0 401 384; Malik *et al.* (1992), *Exp. Hematol.*, 20:1028-1035; Francis (1992), *Focus on Growth Factors*, 3(2):4-10, publicada por Mediscript, Mountain Court, Friern Barnet Lane, Londres N20 OLD, UK; EP 0 154 316; EP 0 401 384; WO 92/16221; WO 95/34326; WO 95/13312; WO 96/11953; WO 96/19459 y WO 96/19459. En ciertas realizaciones, se usa cualquiera de estas reacciones para generar un anticuerpo que es químicamente modificado en su terminal amino.

[0139] En ciertas realizaciones, un anticuerpo está unido a una etiqueta detectable, tal como una etiqueta enzimática, fluorescente, isotópica o de afinidad. En tales ciertas realizaciones, una etiqueta detectable permite la detección o aislamiento del anticuerpo. En ciertas realizaciones, una etiqueta detectable permite la detección de un antígeno enlazado por el anticuerpo.

[0140] En ciertas realizaciones, un anticuerpo es modificado mediante unión del este a uno o más polímeros. En ciertas realizaciones, un anticuerpo está unido a uno o más polímeros solubles en agua. En tales ciertas realizaciones, la unión a un polímero soluble en agua reduce la probabilidad que el anticuerpo se precipitará en un ambiente acuoso, tal como un ambiente fisiológico. En ciertas realizaciones, un anticuerpo terapéutico está unido a un polímero soluble en agua. En ciertas realizaciones, un experto en la técnica puede seleccionar un polímero soluble en agua con base en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, si el conjugado polímero/anticuerpo se usará

en el tratamiento de un paciente y, si es así, el perfil farmacológico del anticuerpo (p.e., vida media, dosis, actividad, antigenicidad, y/u otros factores).

[0141] Ciertos polímeros ejemplares clínicamente aceptables, solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilen glicol (PEG); polietilen glicol propionaldehído; copolímeros de etilen glicol/propilen glicol; monometoxi-polietilen glicol; carboximetilcelulosa; dextrano; polivinil alcohol (PVA); polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano; poli-1,3,6-trioxano; copolímero etileno/anhídrido maléico; poli- β -amino ácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros aleatorios); poli(n-vinil pirrolidona)polietilen glicol; homopolímeros de polipropilen glicol (PPG) y otros óxidos de polialquileno; copolímeros de óxido de polipropileno /óxido de etileno; polioles polioxyetilados (POG) (p.e., glicerol) y otros polioles polioxyetilados; sorbitol polioxyetilado, glucosa polioxyetilado, ácidos colónicos u otros polímeros de carbohidrato; y Ficoll, dextrano, o mezclas de los mismos. Ciertos PEGs ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ciertas formas conocidas en la técnica por ser útiles en la modificación de anticuerpo, tales como mono-alcoxi (C_1 - C_{10})- o ariloxi-PEG. En ciertas realizaciones, el PEG propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua.

[0142] En ciertas realizaciones, un polímero soluble en agua es de cualquier peso molecular. En ciertas realizaciones, un polímero soluble en agua está ramificado o no ramificado. En ciertas realizaciones, un polímero soluble en agua tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa, incluyendo todos los puntos entre los puntos finales del rango. En ciertas realizaciones, un polímero soluble en agua tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 40 kDa. En ciertas realizaciones, un polímero soluble en agua tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 35 kDa. En ciertas realizaciones, un polímero soluble en agua tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 15 kDa a aproximadamente 30 kDa.

[0143] En ciertas realizaciones, un anticuerpo está unido a PEG (p.e., un anticuerpo es "pegilado"). En varias realizaciones, el PEG tiene baja toxicidad en mamíferos. Ver Carpenter et al. (1971) Toxicol. Appl. Pharmacol., 18, 35-40. Notably, un aducto de PEG de adenosine deaminasa fue aprobado en los Estados Unidos para uso en humanos para el tratamiento del síndrome de

inmunodeficiencia combinado severo. En varias realizaciones, el PEG puede reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la unión de PEG a un anticuerpo que tiene secuencias no humanas puede reducir la antigenicidad de ese anticuerpo cuando es administrado a un humano.

[0144] En ciertas realizaciones, un polímero está unido a uno o más residuos de amino ácido reactivos en un anticuerpo. Ciertos residuos de amino ácido reactivos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, el grupo alfa-amino del amino ácido del terminal amino, los grupos amino epsilon de las cadenas laterales de lisina, los grupos sulfhidrilo de las cadenas laterales de cisteína, los grupos carboxilo de las cadenas laterales de aspartilo y glutamilo, el grupo alfa-carboxilo del amino ácido del terminal carboxi, cadenas laterales de tirosina, y cadenas de glicosilo activado unidas a ciertos residuos de asparagina, serina o treonina. Ciertas formas ejemplares de PEG ("reactivos de PEG") adecuadas para la reacción directa con proteínas son conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los reactivos de PEG adecuados para unión a grupos amino incluyen, pero no se limitan a, ésteres activos de ácido carboxílico o derivados de carbonato de PEG, por ejemplo, aquellos en los cuales los grupos salientes son N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenol, imidazol o 1-hidroxi-2-nitrobenceno-4-sulfonato. En ciertas realizaciones, los reactivos de PEG que contienen grupos maleimido o haloacetilo se usan para modificar grupos sulfhidrilo. En ciertas realizaciones, los reactivos de PEG que contienen grupos amino, hidrazina y/o hidrazida se pueden usar en reacciones con aldehídos generados por oxidación con peryodato de grupos carbohidrato en proteínas.

[0145] En ciertas realizaciones, un polímero soluble en agua tiene al menos un grupo reactivo. En ciertas realizaciones, un derivado activado de un polímero soluble en agua, tal como PEG, es creado mediante la reacción del polímero soluble en agua con un grupo activador. En ciertas realizaciones, un grupo activados puede ser monofuncional, bifuncional, o multifuncional. Ciertos grupos activadores ejemplares que se pueden usar para unir un polímero soluble en agua a dos o más anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes grupos: sulfona (p.e., clorosulfona, vinilsulfona y divinilsulfona), maleimida, sulfhidrilo, tiol, triflato, tresilato, azidirina, oxirano y 5-piridilo. En ciertas realizaciones, un derivado de PEG es típicamente estable contra

hidrólisis por períodos extendidos en ambientes acuosos a pHs de aproximadamente 11 o menos. En ciertas realizaciones, un derivado de PEG unido a otra molécula, tal como un anticuerpo, confiere estabilidad de la hidrólisis en esta molécula. Ciertos derivados de PEG homobifuncional eejemplares incluyen, pero no se limitan a, PEG-bis-clorosulfona y PEG-bis-vinilsulfona (ver WO 95/13312).

D. Ciertos métodos para preparar anticuerpos monoclonales

1. Ciertos métodos de hibridoma

[0146] En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales son producidos mediante técnicas estándar. En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales son producidos mediante métodos basados en hibridoma. Tales ciertos métodos son conocidos por los expertos en la técnica. Ver, p.e., Kohler et al. (1975) Nature 256:495-497; Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 6 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). En tales ciertas realizaciones, un animal adecuado, tal como un ratón, rata, hámster, mono, u otro mammal, es inmunizado con un inmunógeno para producir células que secretan anticuerpo. En ciertas realizaciones, las células que secretan anticuerpo son células B, tales como linfocitos o esplenocitos. En ciertas realizaciones, los linfocitos (p.e., linfocitos humanos) son inmunizados *in vitro* para generar células que secretan anticuerpo. Cer, p.e., Borreback et al. (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:3995-3999.

[0147] En ciertas realizaciones, las células que secretan anticuerpo son fusionadas con una línea celular "inmortalizada", tal como una línea celular del tipo mieloide, para producir células de hibridoma. En ciertas realizaciones, las células de hibridoma que producen los anticuerpos deseados son identificadas, por ejemplo, mediante ELISA. En ciertas realizaciones, tales células pueden entonces ser sub-clonadas y cultivadas usando métodos estándar. En ciertas realizaciones, tales células también pueden ser cultivadas *in vivo* como tumores ascitis en un hospedero animal adecuado. En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales son aislados de medio de cultivo de hibridoma, suero, o fluido ascitis usando procedimientos de separación estándar, tales como cromatografía de afinidad. Se provee guía para la producción de

hibridomas y la purificación de anticuerpos monoclonales de acuerdo con ciertas realizaciones, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 8 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0148] En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales de ratón se producen mediante inmunización de ratones alterados genéticamente con un inmunógeno. En tales ciertas realizaciones, los ratones son ratones deficientes de ANGPTL4, que carecen parcialmente o completamente de la función ANGPTL4. En tales ciertas realizaciones, los ratones son ratones “carentes” que carecen total o en parte de un gen que codifica ANGPTL4. En ciertas realizaciones, tales ratones carentes (knockout) son inmunizados con ANGPTL4 de ratón. En ciertas realizaciones, tales ratones carentes (knockout) son inmunizados con ANGPTL4 humanos.

[0149] En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos son propagados en animales transgénicos (p.e., ratones) que son capaces de producir anticuerpos humanos. Ver, p.e., las Patentes U.S. Nos. 6,075,181 A y 6,114,598 A; y WO 98/24893 A2. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los genes de inmunoglobulina humana son introducidos (p.e., usando cromosomas artificiales de levadura, fragmentos de cromosoma humano, o integración de línea germinal) en ratones en los cuales los genes Ig endógenos han sido inactivados. Ver, p.e., Jakobovits et al. (1993) Nature 362:255-258; Tomizuka et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:722-727; y Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156 (que describen la línea XenoMouse II® de ratones transgénicos).

[0150] En ciertas realizaciones, tales ratones transgénicos son inmunizados con un inmunógeno. En tales ciertas realizaciones, se obtienen células linfáticas (tales como células B) de ratones que expresan anticuerpos. En tales ciertas realizaciones, tales células recuperadas son fusionadas con una línea celular “inmortalizada”, tal como una línea celular del tipo mieloide, para producir células de hibridoma. En tales ciertas realizaciones, las células de hibridoma son detectadas y seleccionadas para identificar aquellos que producen anticuerpos específicos al antígeno de interés. Ciertos métodos ejemplares y ratones transgénicos adecuados para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se describen, p.e., en Jakobovits et al.

(1993) Nature 362:255-258; Jakobovits (1995) Curr. Opin. Biotechnol. 6:561-566; Lonberg et al. (1995) Int. Rev. Immunol. 13:65-93; Fishwild et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14:845-851; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156; Green (1999) J. Immunol. Métodos 231:11-23; Tomizuka et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:722-727; y revisados en Little et al. (2000) Immunol. Today 21:364-370; y WO 98/24893. En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos contra ANGPTL4 son adecuados para uso como anticuerpos terapéuticos. Ver Parte V.G., siguiente.

2. Ciertos métodos basados en despliegue

[0151] En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos usando un método basado en despliegue, tal como, por ejemplo, cualquiera de los descritos a continuación.

[0152] En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal se produce usando técnicas de despliegue del fago. Ciertos métodos de despliegue del fago de anticuerpo ejemplares son conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications, de Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O'Brien y Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una genoteca de anticuerpos es desplegada en la superficie de un fago filamentoso, tal como el fago filamentoso no lítico fd o M13. En ciertas realizaciones, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo, tales como scFvs, Fabs, Fvs con un enlace de disulfuro intramolecular diseñado para estabilizar el par V_H - V_L , y diacuerpos. En ciertas realizaciones, los anticuerpos con la especificidad de enlace deseada pueden entonces ser seleccionados. Ciertas realizaciones ejemplares de métodos de despliegue del fago de anticuerpo se describen en más detalle a continuación.

[0153] En ciertas realizaciones, una genoteca de despliegue del fago de anticuerpo se puede preparar usando ciertos métodos conocidos por los expertos en la técnica. Ver, p.e., Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications, de Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O'Brien y Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ). En ciertas realizaciones, los

repertorios de gen variable son preparados mediante amplificación de PCR de ADN genómico o ADNc derivado del ARNm de células que secretan anticuerpo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el ADNc se prepara a partir del ARNm de células B. En ciertas realizaciones, el ADNc que codifica las regiones variables de cadenas pesada y ligera es amplificado, por ejemplo, mediante PCR.

[0154] En ciertas realizaciones, el ADNc de cadena pesada y ADNc de cadena ligera son clonados en un vector adecuado. En ciertas realizaciones, el ADNc de cadena pesada y el ADNc de cadena ligera son combinados aleatoriamente durante el proceso de clonación, produciendo de esta forma el ensamble de una genoteca de ADNc que codifica diversos scFvs o Fabs. En ciertas realizaciones, el ADNc de cadena pesada y el ADNc de cadena ligera están ligados antes de ser clonados en un vector adecuado. En ciertas realizaciones, el ADNc de cadena pesada y el ADNc de cadena ligera son ligados mediante clonación por pasos en un vector adecuado.

[0155] En ciertas realizaciones, el ADNc es clonado en un vector de despliegue del fago, tal como un vector fagémido. Ciertos vectores flagémidos ejemplares, tales como pCES1, son conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el ADNc que codifica ambas cadenas pesada y ligera está presente en el mismo vector. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el ADNc que codifica scFvs es clonado en el marco con todo o una porción del gen III, que codifica la proteína pIII de la cápsida de fago menor. En tales ciertas realizaciones, el fagémido dirige la expresión de la fusión scFv-pIII en la superficie del fago. Alternativamente, en ciertas realizaciones, el ADNc que codifica la cadena pesada (o cadena ligera) es clonado en el marco con todo o parte del gen III, y ADNc que codifica la cadena ligera (o cadena pesada) es clonado aguas debajo de una secuencia de señal en el mismo vector. La secuencia de señal dirige la expresión de la cadena ligera (o cadena pesada) en el periplasma de la célula hospedera, en donde las cadenas pesada y ligera se ensamblan en los fragmentos Fab. Alternativamente, en ciertas realizaciones, el ADNc que codifica la cadena pesada y el ADNc que codifica la cadena ligera están presentes en vectores separados. En tales ciertas realizaciones, el ADNc de cadena pesada y cadena ligera es clonado separadamente, uno en un fagémido y el otro en un vector de fagémido, los

cuales ambos contienen señales para recombinación *in vivo* en la célula hospedera.

[0156] En ciertas realizaciones, el fagémido recombinante o vectores de fago son introducidos en un hospedero bacteriano adecuado, tal como *E. coli*. En ciertas realizaciones que usan fagémido, el hospedero es infectado con fago colaborador para suministrar proteínas estructurales de fago, permitiendo de este modo la expresión de partículas de fago que portan el anticuerpo-proteína de fusión pIII en la superficie del fago.

[0157] En ciertas realizaciones, las genotecas de anticuerpo “sintéticas” son construidas usando repertorios de genes variables que son redistribuidos *in vitro*. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los segmentos de gen individual que codifican cadenas pesadas o ligeras (V-D-J o V-J, respectivamente) son combinadas aleatoriamente usando PCR. En tales ciertas realizaciones, la diversidad de secuencia adicional puede ser introducida en las CDRs, y posiblemente FRs, p.e., mediante PCR susceptible a error. En tales ciertas realizaciones, la diversidad de secuencia adicional es introducida en CDR3, p.e., H3 de la cadena pesada.

[0158] En ciertas realizaciones, las genotecas de despliegue del fago “inocuas” o “universales” son construidas como se describió anteriormente usando ácido nucleico de un animal no inmunizado. En ciertas realizaciones, el animal no inmunizado es un humano. En ciertas realizaciones, las genotecas de despliegue del fago “inmunizadas” son construidas como se describió anteriormente usando ácido nucleico de un animal no inmunizado. En ciertas realizaciones, el animal inmunizado es un humano, rata, ratón, hámster, o mono. En tales ciertas realizaciones, los animales son inmunizados con cualquiera de los inmunógenos descritos más adelante.

[0159] Ciertas genotecas de despliegue del fago de anticuerpo humano, universales ejemplares están disponibles de fuentes comerciales. Ciertas genotecas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, la serie HuCAL[®] de genotecas de MorphoSys AG (Martinstreid/Munich, Alemania); genotecas de Crucell (Leiden, Holanda) usando tecnología MAbstract[®]; la genoteca n-CoDeR[™] Fab de BioInvent (Lund, Suecia); y genotecas disponibles en Cambridge Antibody Technology (Cambridge, UK).

[0160] En ciertas realizaciones, la selección de anticuerpos que tienen la especificidad de enlace deseada desde una genoteca de despliegue del fago se logra mediante pasos de purificación sucesivos. En ciertas realizaciones de purificación, las preparaciones de fado de genoteca son expuestas al antígeno. En tales ciertas realizaciones, los complejos fago-antígeno son lavados, y el fago no enlazado es descartado. En tales ciertas realizaciones, el fago recuperado es recubierto y posteriormente amplificado mediante infección por *E. coli*. En tales ciertas realizaciones, el fago que produce el anticuerpo monoclonal puede ser cloando eligiendo placas simples. En ciertas realizaciones, el proceso anterior es repetido.

[0161] En ciertas realizaciones, el antígeno usado en la purificación es cualquiera de los inmunógenos descritos más adelante. En ciertas realizaciones, el antígeno es inmovilizado en un soporte sólido para permitir la purificación del fago que enlaza antígeno mediante cromatografía de afinidad. En ciertas realizaciones, el antígeno está biotinilado, produciendo así la separación del fago enlazado del fago no enlazado usando perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. En ciertas realizaciones, el antígeno puede ser inmovilizado en células (para purificación directa), en criosecciones de tejido, o en membranas (p.e., membranas de nylon o nitrocelulosa). Otras variaciones de ciertos procedimientos de purificación pueden ser determinados rutinariamente por el experto en la técnica.

[0162] En ciertas realizaciones, se usa un sistema de despliegue de levadura para producir anticuerpos monoclonales. En tales ciertos sistemas, un anticuerpo es expresado como una proteína de fusion con toda o una porción de la proteína AGA2 de levadura, que se despliega en la superficie de la pared celular de la levadura. En tales ciertas realizaciones, las células de levadura que expresan anticuerpos con la especificidad de enlace deseada pueden entonces ser identificadas exponiendo las células a antígeno marcado fluorescentemente. En tales ciertas realizaciones, las células de levadura que enlazan antígeno pueden entonces ser aisladas mediante citometría de flujo. Ver, p.e., Boder et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15:553-557.

3. Ciertos métodos de maduración de afinidad

[0163] En ciertas realizaciones, la afinidad de un anticuerpo para un antígeno particular es aumentada sometiendo el anticuerpo a maduración de afinidad (o “evolución dirigida”) *in vitro*. *In vivo*, los anticuerpos nativos se someten a maduración de afinidad a través de hipermutación somática seguida por selección. Ciertos métodos *in vitro* imitan al proceso *in vivo*, permitiendo así la producción de anticuerpos que tienen afinidades iguales o que superan la de los anticuerpos nativos.

[0164] En ciertas realizaciones de maduración de afinidad, las mutaciones son introducidas en una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de un anticuerpo que tiene la especificidad de enlace deseada. Ver, p.e., Hudson et al. (2003) Nature Med. 9:129-134; Brekke et al. (2002) Nature Reviews 2:52-62. En ciertas realizaciones, las mutaciones son introducidas en la región variable de la cadena pesada, cadena ligera, o ambas. En ciertas realizaciones, las mutaciones son introducidas en una o más CDRs. En tales ciertas realizaciones, las mutaciones son introducidas en H3, L3, o ambas. En ciertas realizaciones, las mutaciones son introducidas en uno o más FRs. En ciertas realizaciones, una genoteca de mutaciones es creada, por ejemplo, en un fago, ribosoma, o genoteca de despliegue de levadura, de forma que los anticuerpos con afinidad aumentada pueden ser identificados mediante métodos de selección estándar. Ver, p.e., Boder et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:10701-10705; Foote et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:10679-10681; Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications, from Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 (O'Brien y Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ); y Hanes et al. (1998) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:14130-14135.

[0165] En ciertas realizaciones, las mutaciones son introducidas mediante mutagénesis específica de sitio con base en la información de la estructura del anticuerpo, p.e., el sitio de enlace a antígeno. En ciertas realizaciones, las mutaciones son introducidas usando mutagénesis combinacional de CDRs. En ciertas realizaciones, toda o una porción de la secuencia que codifica la región variable es mutagenizada aleatoriamente, p.e., usando células mutadoras de *E. coli*, reordenamiento de gen homólogo, o PCR

susceptible a error. En ciertas realizaciones, las mutaciones son introducidas usando "mezclado de ADN." Ver, p.e., Crameri et al. (1996) Nature Med. 2:100-102; Fermer et al. (2004) Tumor Biology 25:7-13.

[0166] En ciertas realizaciones, el "mezclado de cadena" se usa para generar anticuerpos con afinidad aumentada. En ciertas realizaciones de mezclado de cadena, una de las cadenas, p.e., la cadena ligera, es reemplazada con un repertorio de cadenas ligeras, mientras que la otra cadena, p.e., la cadena pesada, no es cambiada, proporcionando así especificidad. En tales ciertas realizaciones, se crea una genoteca de anticuerpos de cadena mezclada, en donde la cadena pesada no cambiada es expresada en combinación con cada cadena ligera del repertorio de cadenas ligeras. En ciertas realizaciones, tales genotecas pueden entonces ser seleccionadas para anticuerpos con afinidad aumentada. En ciertas realizaciones, tanto las cadenas ligeras como las pesadas son reemplazadas secuencialmente. En ciertas realizaciones, solamente las regiones variables de las cadenas pesadas y/o ligeras son reemplazadas. En ciertas realizaciones, solamente una porción de las regiones variables, p.e., las CDRs, de las cadenas pesada y/o ligera son reemplazadas. Ver, p.e., Hudson et al. (2003) Nature Med. 9:129-134; Brekke et al. (2002) Nature Reviews 2:52-62; Kang et al. (1991) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:11120-11123; Marks et al. (1992) Biotechnology 10:779-83.

[0167] En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales de ratón que enlazan específicamente ANGPTL4 humana (incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales de ratón propagados contra ANGPTL4 de ratón pero que se enlazan específicamente (p.e., reaccionan cruzadamente) con ANGPTL4 humana) son sometidos a mezclado de cadena secuencial. En ciertas realizaciones, por ejemplo, la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal de ratón dada es combinada con un nuevo repertorio de cadenas ligeras humanas, y se seleccionan los anticuerpos con la afinidad deseada. En tales ciertas realizaciones, las cadenas ligeras de los anticuerpos seleccionadas son entonces combinadas con un nuevo repertorio de cadenas pesadas humanas, y se seleccionan los anticuerpos con la afinidad deseada. Así, en ciertas realizaciones, se seleccionan los anticuerpos humanos que tienen la especificidad y afinidad de enlace a antígeno deseada.

[0168] Alternativamente, en ciertas realizaciones, la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal de ratón dada es combinada con un nuevo repertorio de cadenas ligeras humanas, y se seleccionan los anticuerpos con la afinidad deseada de esta primera ronda de mezclado. En ciertas realizaciones, la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón original es combinada con un nuevo repertorio de cadenas pesadas humanas, y se seleccionan los anticuerpos con la afinidad deseada a partir de esta segunda ronda de mezclado. En ciertas realizaciones, las cadenas ligeras humanas a partir de los anticuerpos seleccionados en la primera ronda de mezclado son entonces combinados con cadenas pesadas humanas de los anticuerpos seleccionados en la segunda ronda de mezclado. Así, en ciertas realizaciones, se seleccionan anticuerpos humanos que tienen la especificidad y afinidad de enlace a antígeno deseada.

[0169] En ciertas realizaciones, se usa un método de “despliegue de ribosoma” que alterna la selección de anticuerpo con maduración de afinidad. En ciertas realizaciones de un método de despliegue de ribosoma, el ácido nucleico que codifica anticuerpo es amplificado mediante RT-PCR entre los pasos de selección. Así, en ciertas realizaciones, se pueden usar polimerasas susceptibles a error para introducir mutaciones en el ácido nucleico. Un ejemplo no limitante de tal método se describe en detalle en Hanes et al. (1998) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:14130-14135.

4. Ciertos métodos recombinantes

[0170] En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal es producido mediante técnicas recombinantes. Ver, p.e., *la Patente* U.S. No. 4,816,567. En tales ciertas realizaciones, el ácido nucleico que codifica las cadenas de anticuerpo monoclonal es clonado y expresado en una célula hospedera adecuada. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el ARN puede ser preparado a partir de células que expresan el anticuerpo deseado, tales como células B maduras o células de hibridoma, usando métodos estándar. En ciertas realizaciones, el ARN puede entonces ser usado para preparar ADNc usando métodos estándar. En ciertas realizaciones, el ADNc que codifica un polipéptido de cadena pesada o ligera es amplificado, por ejemplo, mediante PCR, usando cebadores de oligonucleótido específicos. En ciertas realizaciones, el ADNc es clonado en un vector de expresión adecuado. En

ciertas realizaciones, el vector de expresión es entonces transformado o transfectado en una célula hospedera adecuado, tal como una célula hospedera que no produce endógenamente el anticuerpo. Ciertas células hospederas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, *E. coli*, células COS, células de ovario de hámster Chino (CHO), y células de mieloma. En ciertas realizaciones, en donde las cadenas pesada y ligera están coexpresadas en el mismo hospedero, el anticuerpo reconstituido puede ser aislado.

[0171] En ciertas realizaciones, el ADNc que codifica una cadena pesada o ligera puede ser modificado. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la región constante de una cadena pesada o ligera de ratón puede ser reemplazada con la región constante de una cadena pesada o ligera humana. De esta forma, en ciertas realizaciones, se puede producir un anticuerpo quimérico que posee regiones constantes de anticuerpo humano pero retiene la especificidad de enlace de un anticuerpo de ratón.

[0172] En ciertas realizaciones, los anticuerpos recombinantes pueden ser expresados en ciertas líneas celulares. En ciertas realizaciones, se pueden usar secuencias que codifican anticuerpos particulares para la transformación de una célula hospedera mamífera adecuada. De acuerdo con ciertas realizaciones, la transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedera. Ciertos métodos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, empaque del polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducción de una célula hospedera con el virus (o vector) y usar ciertos procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ejemplifican en las Patentes U.S. Nos. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461, y 4,959,455. En ciertas realizaciones, el proceso de transformación usado puede depender del hospedero a ser transformado. Ciertos métodos ejemplares para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células mamíferas son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión del protoplasto, electroporación, encapsulación de(los) polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en núcleos.

[0173] Ciertas líneas celulares mamífera ejemplares disponibles como hospederos para expresión son conocidos en la técnica, pero no se limitan a,

muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection) (ATCC), incluyendo pero sin limitarse a, células de ovario de hámster Chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster cachorro (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p.e., Hep G2), y un número de otras líneas celulares. En ciertas realizaciones, las líneas celulares pueden ser seleccionadas determinando cuales líneas celulares producen niveles altos de anticuerpos que enlazan específicamente ANGPTL4.

E. Ciertos inmunógenos de polipéptido

[0174] En ciertas realizaciones, para generar anticuerpos, un animal es inmunizado con un inmunógeno. En ciertas realizaciones, un inmunógeno es un polipéptido que comprende ANGPTL4. En ciertas realizaciones, un inmunógeno es un polipéptido que comprende un fragmento de ANGPTL4. En ciertas realizaciones, un inmunógeno es un polipéptido que comprende el dominio de hélice enrollada N-terminal de ANGPTL4.

[0175] En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende un ANGPTL4 de ratón. En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende un ANGPTL4 de ratón que comprende la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende una ANGPTL4 de ratón que comprende la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO: 50. En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende un fragmento de ANGPTL4 de ratón. En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende un fragmento de la SEQ ID NO: 1 desde el residuo 21 al residuo 174. En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende un fragmento de la SEQ ID NO: 50 desde el residuo 21 al residuo 174. En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende cualquier péptido de aproximadamente 10-20 amino ácidos contiguos desde el residuo 21 al residuo 174 de la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende cualquier péptido de aproximadamente 10-20 amino ácidos contiguos desde el residuo 21 al residuo 174 de la SEQ ID NO: 50. En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende un péptido seleccionado de cualquiera de las SEQ ID NOs: 40 a 48. En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende un péptido seleccionado de las SEQ ID NOs: 40, 41, 42, y 43. En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende un péptido que comprende una o más secuencias de amino ácido seleccionadas de las SEQ

ID NOs: 40, 41, 42, y 43. En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende un péptido que comprende las SEQ ID NOs: 41, 42, y 43. En tales ciertas realizaciones, se selecciona un péptido que es probablemente inmunogénico. En tales ciertas realizaciones, se selecciona un péptido que se predice que es hidrofílico y/o probablemente está expuesto en la superficie de ANGPTL4 de ratón nativo en su estado plegado. Se provee guía ejemplar para seleccionar péptidos inmunogénicos adecuados, por ejemplo, en Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology Ch. 11.14 (John Wiley & Sons, NY); y Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 5 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0176]Ciertos algoritmos ejemplares son conocidos por los expertos en la técnica para predecir si un segmento de péptido de una proteína es hidrofílico y por lo tanto probablemente estar expuesto en la superficie de la proteína. Tales ciertos algoritmos usan la información de secuencia primaria de una proteína para hacer tales predicciones. Tales ciertos algoritmos se basan en el método de, por ejemplo, Hopp y Woods (1981) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 78:3824-3828, o Kyte y Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157:105-132. Ciertos algoritmos ejemplares son conocidos por los expertos en la técnica para predecir la estructura secundaria de una proteína con base en la secuencia de amino ácido primaria de la proteína. Ver, p.e., Corrigan et al. (1982) Comput. Programs Biomed. 3:163-168. Tales ciertos algoritmos se basan en el método de, por ejemplo, Chou y Fasman (1978) Ann. Rev. Biochem. 47:25-276. En ciertas realizaciones, los segmentos de péptido que se predice que forman giros β , y por lo tanto probablemente están expuestos en la superficie de una proteína, pueden ser seleccionados como inmunógenos.

[0177]En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende una ANGPTL4 humana. En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende una ANGPTL4 humana que comprende la secuencia de amino ácido de la SEQ ID NO:2. En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende un fragmento de la SEQ ID NO:2 desde el residuo 21 al residuo 169. En ciertas realizaciones, un inmunógeno comprende cualquier péptido de aproximadamente 10-20 amino ácidos contiguos desde el residuo 21 al residuo 169 de la SEQ ID NO:2. En tales ciertas realizaciones, se selecciona un péptido que probablemente será inmunogénico. En tales ciertas realizaciones, se selecciona un péptido que se

predice que es hidrofílico y/o probablemente estará expuesto en la superficie de ANGPTL4 humana nativa en su estado plegado. Se provee guía ejemplar para seleccionar péptidos inmunogénicos adecuados, por ejemplo, en Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology Ch. 11.14 (John Wiley & Sons, NY); y Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 5 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0178] En ciertas realizaciones, un animal es inmunizado con un inmunógeno y uno o más adyuvantes. En ciertas realizaciones, se usa un adyuvante para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedera. Ciertos adyuvantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund (complete e incompleto), sales minerales tales como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, sustancias activas de superficie, quitosán, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. En ciertas realizaciones, la respuesta inmune a un inmunógeno, p.e., un inmunógeno de péptido, es mejorada acoplando el inmunógeno a otra molécula inmunógena o "proteína portadora". Ciertas proteínas portadoras ejemplares incluyen, pero no se limitan a, hemocianina extraída de molusco (KLH), toxoide del tétano, toxoide de la difteria, ovalbúmina, toxoide del cólera, y fragmentos inmunogénicos de los mismos. Para guía ejemplar del acoplamiento del inmunógenos de péptido a proteínas portadoras, ver, p.e., Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology Ch. 11.15 (John Wiley & Sons, NY); y Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 5 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0179] En ciertas realizaciones, cualquiera de los inmunógenos anteriores puede ser producido usando métodos recombinantes estándar. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un polinucleótido que codifica una ANGPTL4 de ratón o humana o un fragmento de ese polinucleótido, puede ser clonado en un vector de expresión adecuado. En ciertas realizaciones, el polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4. En ciertas realizaciones, el vector recombinante es entonces introducido en una célula hospedera adecuada. En ciertas realizaciones, el polipéptido es entonces aislado de la célula hospedera mediante métodos estándar. Para ciertos métodos ejemplares de expresión de proteína

recombinante, ver, p.e., Ausubel et al. (1991) Current Protocols in Molecular Biology Ch. 16 (John Wiley & Sons, NY).

F. Ciertos ensayos

1. Ciertos ensayos de enlace

[0180] En ciertas realizaciones, se seleccionaron anticuerpos para enlace a ANGPTL4 utilizando ciertos métodos de rutina que detectan el enlace de anticuerpo al antígeno. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se ensayó la capacidad de un anticuerpo monoclonal para unirse a ANGPTL4 por medio de métodos estándar de inmunoelectrotransferencia, tales como transferencia de tipo Western. Ver, por ejemplo, Ausubel et al. (1992) Current Protocols in Molecular Biology Ch. 10.8 (John Wiley & Sons, NY); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). En ciertas realizaciones, se puede aislar el ANGPTL4 a ser utilizado en tales ensayos o puede estar presente en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

[0181] En ciertas realizaciones, se ensayó la capacidad de un anticuerpo monoclonal para enlazarse ANGPTL4 utilizando un ensayo de enlace competitivo, el cual evalúa la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un anticuerpo anti-ANGPTL4 conocido por enlazarse a ANGPTL4. En tales ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-ANGPTL4 conocido es cualquiera de los anticuerpos monoclonales descritos a continuación en la Parte VI.J. En ciertas realizaciones, se llevó a cabo un ensayo de enlace competitivo utilizando ELISA. Ver, por ejemplo, Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual Ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0182] En ciertas realizaciones, se utilizó un ensayo de enlace para cuantificar las cinéticas de enlace (por ejemplo, constante de velocidad) o la afinidad de enlace (por ejemplo, la constante de asociación o disociación) de un anticuerpo contra ANGPTL4. En ciertas realizaciones, las cinéticas o afinidad de enlace se determinaron en la "fase sólida" mediante la inmovilización del antígeno (por ejemplo, ANGPTL4) sobre un soporte sólido. El antígeno inmovilizado "captura" el anticuerpo desde la solución. En ciertas realizaciones, las cinéticas o afinidad de enlace se determinaron en la "fase

sólida” mediante la inmovilización del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo contra ANGPTL4) sobre un soporte sólido. El anticuerpo inmovilizado “captura” el antígeno desde la solución.

[0183] En ciertas realizaciones, se determinaron las cinéticas de enlace o la afinidad de enlace utilizando métodos basados en ELISA. En ciertas realizaciones, se determinaron las cinéticas de enlace o la afinidad de enlace utilizando tecnología basada en biosensores, tal como la tecnología de resonancia de plasmón superficial de Biacore (Biacore, Piscataway, NJ). Tales ciertos métodos son conocidos por aquellos expertos en la técnica. *Ver, por ejemplo*, McCafferty et al. (eds.) (1996) Antibody Engineering: A Practical Approach (IRL, Oxford, UK); Goldberg et al. (1993) Curr. Opin. Immunol. 5:278-281; Karlsson et al. (1991) J. Immunol. Methods 145:229-240; Malmqvist (1993) Curr. Opin. Immunol. 5:282-286; para revisión, ver Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications, de Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 en 19 (O'Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ).

[0184] En ciertas realizaciones, se determinaron las cinéticas de enlace o la afinidad de enlace de un fragmento Fab que se enlaza específicamente a ANGPTL4. En ciertas instancias, los fragmentos Fab tienen la propiedad de no multimerizar. La multimerización puede, en ciertas instancias, complicar la medida de las cinéticas de enlace y la afinidad de enlace en métodos de “fase sólida”. *Ver, por ejemplo*, Hoogenboom, Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications, de Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178:1-37 en 19 (O'Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, NJ). Por lo tanto, en ciertas realizaciones, un fragmento Fab que se enlaza específicamente a ANGPTL4 es adecuado para uso en un ensayo de enlace en el cual el antígeno se inmoviliza en un soporte sólido, tal como, por ejemplo, un ensayo basado en ELISA o un ensayo Biacore. En ciertas realizaciones, los fragmentos Fab se generaron a partir de un anticuerpo intacto que se enlaza específicamente a ANGPTL4 utilizando métodos enzimáticos. En ciertas realizaciones, los fragmentos Fab se produjeron mediante la expresión de ácidos nucleicos que codifican a los fragmentos Fab en un sistema de expresión recombinante, tal como aquellos descritos anteriormente, Parte V.D.3.

[0185] En ciertas realizaciones, se determinaron las cinéticas de enlace o la afinidad de enlace de un anticuerpo contra ANGPTL4 utilizando métodos de "fase en solución". En tales métodos, las cinéticas o afinidad de enlace se midieron para un complejo anticuerpo-antígeno en solución. Tales ciertos métodos son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Un ejemplo no limitante de tal método es el "ensayo de exclusión cinética" o "KinExA." Ver, *por ejemplo*, Blake et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:27677-27685; Drake et al. (2004) Anal. Biochem. 328:35-43 (comparación de los métodos Biacore "fase sólida" y KinExA "fase en solución"). En ciertas realizaciones, la instrumentación para desarrollar el KinExA es suministrada por Sapidyne Instruments, Inc. (Boise, ID).

[0186] En ciertas realizaciones, se determinaron las cinéticas de enlace o la afinidad de enlace de un anticuerpo multivalente o un anticuerpo que utilizando un método de fase en solución. En ciertas instancias, la medición de las cinéticas de enlace o la afinidad de enlace de un anticuerpo multivalente o un anticuerpo que multimeriza es favorable para un análisis de fase en solución.

[0187] En ciertas realizaciones, la afinidad de enlace de un anticuerpo anti-ANGPTL4, tal como se midió mediante su K_D , es aproximadamente 10^{-6} M o menos. En ciertas realizaciones, la afinidad de enlace de un anticuerpo anti-ANGPTL4 es aproximadamente 10^{-7} M, aproximadamente 10^{-8} M, o aproximadamente 10^{-9} M o menos. En tales ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-ANGPTL4 puede utilizarse como un anticuerpo terapéutico. Ver, *por ejemplo*, Hudson et al. (2003) Nature Med. 9:129-134. En ciertas realizaciones, las afinidades de enlace de menos de 10^{-9} M (por ejemplo, las afinidades de enlace desde aproximadamente 500 pM hasta aproximadamente 0.5 pM, que incluyen pero no se limitan a, las afinidades de enlace desde aproximadamente 100 pM hasta aproximadamente 5 pM) son alcanzables, por ejemplo, utilizando técnicas de maduración de afinidad. Ver, *por ejemplo*, Boder et al. (2000) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 97:10701-10705.

[0188] En ciertas realizaciones, se selecciona un anticuerpo monoclonal que se elevó contra ANGPTL4 de ratón para enlace específico a ANGPTL4 humano utilizando ciertos métodos de detección de rutina, por ejemplo, tal como aquellos aquí descritos. La capacidad de un anticuerpo monoclonal para

enlazarse tanto a ANGPTL4 de ratón y humano (esto es, para demostrar "reactividad cruzada") indica la presencia del mismo epítipo en ANGPTL4 de ratón y humano. En ciertas realizaciones de métodos de detección que emplean condiciones desnaturalizantes (por ejemplo, transferencia de tipo Western), la reactividad cruzada indica que un anticuerpo monoclonal de ratón se enlaza al mismo epítipo "lineal" en ANGPTL4 de ratón y humano. En ciertas realizaciones de métodos de detección que emplean condiciones no desnaturalizantes, la reactividad cruzada indica que un anticuerpo monoclonal de ratón se enlaza al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o un epítipo conformacional) en ANGPTL4 de ratón y humano.

2. Ciertos métodos para mapeo de epítipo

[0189] En diversas realizaciones, se identifica el epítipo al cual un anticuerpo monoclonal se une por medio de cualquiera de un número de ensayos. Ciertos ensayos ejemplares se describen, por ejemplo, en Morris, Methods in Molecular Biology Vol.66: Epitope Mapping Protocols (1996) (Humana Press, Totowa, NJ). Por ejemplo, puede realizarse el mapeo de epítipo por medio de ensayos de expresión de fragmento de gen o ensayos basados en péptido. En ciertas realizaciones de un ensayo de expresión de fragmento de gen, por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de ANGPTL4 se expresan en células procarióticas y se aíslan. En tales ciertas realizaciones, la capacidad de un anticuerpo monoclonal para enlazar aquellos fragmentos se evalúa posteriormente, por ejemplo, por medio de inmunoprecipitación o inmunoelectrotransferencia. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de ANGPTL4 se transcriben y traducen *in vitro* en la presencia de aminoácidos radioactivos. Los fragmentos marcados radiactivamente de ANGPTL4 son probados posteriormente para enlace a un anticuerpo monoclonal. En ciertas realizaciones, los fragmentos de ANGPTL4 se generaron por medio de fragmentación proteolítica. En ciertas realizaciones, se identifica un epítipo utilizando genotecas de péptidos aleatorios exhibidos sobre la superficie de un fago o levadura. En ciertas realizaciones, se identifica un epítipo mediante la evaluación de una genoteca de fragmentos de péptido sintéticos de ANGPTL4 que se solapan para enlace a un anticuerpo monoclonal. En ciertas realizaciones, se identifica un epítipo utilizando un ensayo de competencia, tal como aquellos descritos a continuación.

3. Ciertos ensayos de competencia

[0190] En ciertas realizaciones, se identifican los anticuerpos monoclonales que se enlazan al mismo epítipo de ANGPTL4 como un anticuerpo monoclonal de interés. En ciertas realizaciones, tales anticuerpos monoclonales son identificados por medio de mapeo de epítipo, por ejemplo, tal como se describió anteriormente. En ciertas realizaciones, tales anticuerpos monoclonales son identificados por medio de ensayos de competencia de rutina. Ver, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). En un ensayo de competencia ejemplar no limitante, se inmoviliza ANGPTL4 o un fragmento del mismo dentro de los pozos de una placa de múltiples pozos. En tales ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal de interés se marca con marcador fluorescente (en ciertas realizaciones, isotiocianato de fluoresceína) mediante métodos estándar. En tales ciertas realizaciones, se adicionan mezclas del anticuerpo monoclonal marcado de interés y un anticuerpo monoclonal de prueba no marcado a los pozos. En tales ciertas realizaciones, se cuantifica la fluorescencia en cada pozo para determinar el grado al cual el anticuerpo monoclonal de prueba no marcado bloquea el enlace del anticuerpo monoclonal marcado de interés. En ciertas realizaciones, se considera que los anticuerpos monoclonales comparten un epítipo si cada uno bloquea el enlace del otro en un 50% o más. Los ensayos de competencia ejemplares también se describen, por ejemplo, en Morris, Methods in Molecular Biology Vol.66: Epitope Mapping Protocols (1996) (Humana Press, Totowa, NJ). A continuación se proporciona un ensayo de competencia ejemplar no limitante, Parte VI.O.

4. Ciertos ensayos para la identificación de anticuerpos neutralizantes

[0191] En ciertas realizaciones, se seleccionan los anticuerpos monoclonales para aquellos que son anticuerpos neutralizantes, esto es, aquellos que reducen una actividad de ANGPTL4 *in vivo* y/o *in vitro*. En ciertas realizaciones, una actividad de ANGPTL4 es la capacidad de ANGPTL4 para inhibir LPL. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se identifica un anticuerpo neutralizante por su capacidad para incrementar la actividad de LPL en la

presencia de ANGPTL4. En tales ciertas realizaciones, un anticuerpo neutralizante incrementa la actividad de LPL en al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ó 95%, relativa a un anticuerpo de control. Ciertos ensayos ejemplares para la medición de la actividad LPL *in vivo* e *in vitro* se proporcionan a continuación, Parte VI.D. y VI.I, respectivamente.

[0192] En ciertas realizaciones, se identifica un anticuerpo neutralizante que reduce una actividad de ANGPTL4 *in vivo* por medio de su capacidad para disminuir el nivel de al menos un lípido en suero. Ciertos lípidos del suero ejemplares incluyen, pero no están limitados a, triglicéridos, colesterol, y ácidos grasos libres. En tales ciertas realizaciones, un anticuerpo neutralizante disminuye el nivel de al menos un lípido en suero en al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ó 95%, relativo a un anticuerpo de control. En ciertas realizaciones, se identifica un anticuerpo neutralizante que reduce una actividad de ANGPTL4 *in vivo* por su capacidad para contrarrestar o conferir protección para ciertos efectos de una dieta que contiene grasa. Ciertos efectos ejemplares incluyen, pero no están limitados a, ganancia de peso, obesidad, intolerancia a la glucosa (hiperglicemia), insensibilidad a la insulina (hiperinsulinemia), esteatosis hepática (hígado graso), y acumulación de lípido intramocelular. Ciertos ensayos ejemplares para la medición de tales efectos se proporcionan a continuación, Parte VI.C., VI.E., y VI.F.

G. Ciertas composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento utilizando anticuerpos monoclonales neutralizantes

[0193] En ciertas realizaciones, un anticuerpo neutralizante puede utilizarse como un anticuerpo terapéutico. Ciertos anticuerpos neutralizantes ejemplares para ser utilizados como anticuerpos terapéuticos incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y anticuerpos humanos. Aquellos expertos en la técnica están familiarizados con el uso de ciertos anticuerpos como agentes terapéuticos. Por ejemplo, ha sido aprobada más de una docena de anticuerpos por la FDA para uso como agentes terapéuticos desde mediados de la década de 1980. Ver, por ejemplo, Hudson et al. (2003) Nature Med. 9:129-134; Gura (2002) Nature 417:584-586;

Brekke et al. (2002) Nature Reviews 2:52-62. Ciertos anticuerpos aprobados por la FDA incluyen aquellos utilizados para tratar diversos cánceres, inflamación, e infecciones virales y para prevenir el rechazo de transplantes. Ver, por ejemplo, Gura (2002) Nature 417:584-586; Brekke et al. (2002) Nature Reviews 2:52-62. Adicionalmente, más de una docena de anticuerpos están actualmente en ensayos clínicos. Ver, por ejemplo, Brekke et al. (2002) Nature Reviews 2:52-62.

[0194] En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para el tratamiento de un trastorno del metabolismo de lípido que comprende la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo neutralizante contra ANGPTL4. En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar un trastorno agudo del metabolismo de lípido que comprende la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo neutralizante contra ANGPTL4. En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar un trastorno crónico del metabolismo de lípido que comprende la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo neutralizante contra ANGPTL4.

[0195] Tal como se emplea aquí, “trastornos del metabolismo de lípido” incluyen, pero no están limitados a, trastornos que puedan conducir a hiperlipidemia secundaria (incluyendo hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia). Ciertos trastornos del metabolismo de lípidos ejemplares incluyen, pero no están limitados a, aterosclerosis, dislipidemia, hipertrigliceridemia (incluyendo hipertrigliceridemia inducida por fármaco, hipertrigliceridemia inducida por diurético, hipertrigliceridemia inducida por alcohol, hipertrigliceridemia inducida por agente bloqueador β -adrenérgico, hipertrigliceridemia inducida por estrógeno, hipertrigliceridemia inducida por glucocorticoide, hipertrigliceridemia inducida por retinoide, hipertrigliceridemia inducida por cimetidina, y hipertrigliceridemia familiar), pancreatitis aguda asociada con hipertrigliceridemia, síndrome de quilomicrón, quilomicronemia, deficiencia de Apo-E, deficiencia de LPL o hipoactividad, hiperlipidemia (incluyendo hiperlipidemia familiar combinada), hipercolesterolemia, gota asociada con hipercolesterolemia, xantomatosis (depósitos subcutáneos de colesterol), enfermedad de arteria coronaria (también llamada enfermedad de corazón isquémico), inflamación asociada con enfermedad de arteria coronaria, restenosis, enfermedades vasculares periféricas, y choque. Ciertos trastornos del metabolismo de lípidos ejemplares incluyen, pero no están limitados a,

trastornos relacionados con el peso corporal, tales como obesidad, síndrome metabólico que incluye componentes independientes del síndrome metabólico (por ejemplo, obesidad central, FBG/pre-diabetes/diabetes, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, e hipertensión), hipotiroidismo, uremia, y otras condiciones asociadas con ganancia de peso (incluyendo ganancia rápida de peso), pérdida de peso, mantenimiento de la pérdida de peso, o riesgo de recobro seguido por pérdida de peso. Ciertos trastornos del metabolismo de lípido ejemplares incluyen, pero no están limitados a, trastornos relacionados con el azúcar en la sangre, tales como diabetes, hipertensión, y síndrome de ovario poliquístico relacionado a resistencia a la insulina. Ciertos trastornos del metabolismo de lípido ejemplares incluyen, pero no están limitados a, trasplante renal, síndrome nefrótico, síndrome de Cushing, acromegalia, lupus eritematoso sistémico, disglobulinemia, lipodistrofia, glicogenosis tipo I, y enfermedad de Addison.

[0196] Trastornos del metabolismo de lípido incluyen, pero no están limitados a hipertriglicerolemia secundaria (HTG, incluyendo pero no limitado a los tipos I, V, y IV), que incluye pero no se limita a, HTG debido a la dieta (incluyendo, pero no limitado a, consumo excesivo de alcohol, ganancia de peso, y obesidad), fármacos (incluyendo pero no limitado a, estrógeno exógeno, tamoxifeno, retinoides, tiazidas, clortalidona, bloqueadores beta, inhibidores de proteasa (incluyendo pero no limitado a ritonavir), infusión de propofol, e infusiones parenterales de lípido), trastornos del metabolismo (incluyendo pero no limitado a diabetes, embarazo, falla renal crónica, hipotiroidismo, hiperlipidemia familiar, y pancreatitis).

[0197] Trastornos del metabolismo de lípido incluyen, pero no están limitados a, trastornos de lípido asociados con disfunción del acceso vascular, trastornos de lípido asociados con enfermedades proliferativas, que incluyen pero no se limitan a, neoplasia (incluyendo pero no limitado a cánceres de próstata, riñón, hígado, seno, ovario, pulmón, y pancreático), trastornos que ocurren en respuesta a inflamación, que incluye pero no se limita a, aquellos asociados con, por ejemplo, enfermedades infecciosas, curación de heridas, síndromes de inmunodeficiencia (SIDA y otros, que incluye pero no se limita a aquellos síndromes asociados con desarrollo aberrante), formación de cicatriz, aterosclerosis, restenosis y rechazo de trasplante, trastornos autoinmunes, y enfermedades y trastornos inflamatorios crónicos, los cuales incluyen pero no

están limitados a, enfermedades que incluyen pero no se limitan a artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, y trastornos que incluyen pero no se limitan a enfermedad de Crohn, colitis, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reactiva, incluyendo enfermedad de Lyme, diabetes dependiente de insulina, autoinmunidad órgano específica, esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Grave, síndrome de Sjogren, dermatitis por contacto, soriasis, escleroderma, enfermedad de injerto versus hospedero, sarcoidosis, malaria, sepsis, pancreatitis, condiciones atópicas, que incluyen pero no se limitan a asma y alergia, que incluyen pero no se limitan a rinitis alérgica, alergias gastrointestinales, que incluyen pero no se limitan a alergias a alimentos, eosinofilia, conjuntivitis y nefritis glomerular, trastornos de coagulación de la sangre, choque endotóxico y otros trastornos mediados por inflamación tales como apnea del sueño y somnolencia.

[0198] En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para el tratamiento de un trastorno del metabolismo de lípido que comprende la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo para ANGPTL4 y otro agente terapéutico. En tales ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional se administra en una cantidad efectiva. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es otro anticuerpo para ANGPTL4. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente no anticuerpo. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente que disminuye el nivel de uno o más lípidos en el suero. Ciertos agentes terapéuticos adicionales ejemplares incluyen, pero no están limitados a, inhibidores de la síntesis de colesterol (estatinas), tales como inhibidores de la HMG-CoA reductasa (por ejemplo, lovastatina, simvastatina, pravastatina, y fluvastatina); agentes secuestrantes de bilis, tales como colestiramina y otras resinas; inhibidores de secreción de VLDL, tales como niacina; estimulantes de la lipoproteína lipasa, tales como derivados de ácido fibrótico; antioxidantes lipofílicos, tales como Probucol; inhibidores de acil-CoA colesterol acil transferasa; antagonistas del receptor farnesoide X; activadores de la proteína activante de la escisión de la proteína enlazante reguladora de esterol (SCAP); inhibidores de la proteína de transferencia de triglicérido microsomal (MTP); y péptido relacionado a ApoE. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente que eleva la lipoproteína de alta densidad (HDL). Los ejemplos no limitantes de tales agentes incluyen, pero no están limitados a, inhibidores de la proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP).

[0199] En ciertas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo para ANGPTL4 y un diluyente, portador, solubilizante, emulsificante, preservativo y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo para ANGPTL4 y una cantidad efectiva de al menos un agente terapéutico adicional, junto con un diluyente, portador, solubilizante, emulsificante, preservativo y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, el al menos un agente terapéutico adicional se selecciona de aquellos descritos anteriormente.

[0200] En ciertas realizaciones, los materiales de formulación para las composiciones farmacéuticas son no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas.

[0201] En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende materiales de formulación para modificar, mantener o preservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o penetración de la composición. En ciertas realizaciones, los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no están limitados a, aminoácidos (por ejemplo, glicina, glutamina, asparagina, arginina y lisina); antimicrobianos; antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, sulfito de sodio y sulfito ácido de sodio); soluciones amortiguadoras (por ejemplo, borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos y otros ácidos orgánicos); agentes de volumen (por ejemplo, manitol y glicina); agentes quelantes (por ejemplo, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA)); agentes complejantes (por ejemplo, cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina, e hidroxipropil-beta-ciclodextrina); rellenos; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa y dextrinas); proteínas (por ejemplo, albúmina de suero, gelatina e inmunoglobulinas); agentes colorantes, saborizantes, y diluyentes; agentes emulsificantes; polímeros hidrofílicos (por ejemplo, polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (por ejemplo, sodio); preservativos (por ejemplo, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, fenetil alcohol, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y peróxido de hidrógeno); solventes

(por ejemplo, glicerina, propilenglicol y polietilenglicol); azúcares de alcoholes (por ejemplo, manitol y sorbitol); agentes de suspensión; surfactantes o agentes humectantes (por ejemplo, plurónicos, PEG, ésteres de sorbitan, polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80), triton, trometamina, lecitina, colesterol, y tiloxapal); agentes mejoradores de la estabilidad (por ejemplo, sacarosa y sorbitol); agentes mejoradores de la tonicidad (por ejemplo, haluros de metal alcalino (por ejemplo, cloruro de sodio o potasio), manitol, y sorbitol); vehículos de liberación; diluyentes; excipientes; y adyuvantes farmacéuticos. (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1990).

[0202] En ciertas realizaciones, un anticuerpo para ANGPTL4 u otra molécula terapéutica está unida a un vehículo que extiende la vida media. Ciertos vehículos que extienden la vida media ejemplares son conocidos en el estado de la técnica. Tales de ciertos vehículos incluyen, pero no están limitados a, el dominio Fc, polietilenglicol, y dextrano. Tales de ciertos vehículos se describen, por ejemplo, en la solicitud PCT publicada No. WO 99/25044.

[0203] En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica óptima será determinada por una persona experta en la técnica dependiendo de, por ejemplo, la ruta prevista de administración, el formato de liberación, y la dosificación deseada. Ver, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, *supra*. En ciertas realizaciones, tales composiciones pueden influir el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo*, o velocidad de separación *in vivo* de un anticuerpo neutralizante.

[0204] En ciertas realizaciones, un vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser bien sea de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica, o fluido cerebroespinal artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. Ciertos vehículos ejemplares incluyen, pero no están limitados a, solución salina neutra amortiguada y solución salina mezclada con albúmina de suero. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden solución amortiguadora de Tris de aproximadamente pH 7.0-8.5, o solución

amortiguadora de acetato de aproximadamente pH 4.0-5.5, las cuales pueden incluir adicionalmente sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. En ciertas realizaciones, una composición que comprende un anticuerpo para ANGPTL4, sin o con al menos un agente terapéutico adicional, puede prepararse para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado deseado de pureza con agentes de formulación adicionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) en la forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. En ciertas realizaciones, una composición que comprende un anticuerpo para ANGPTL4, sin o con al menos un agente terapéutico adicional, puede formularse como un liofilizado utilizando excipientes apropiados tales como sacarosa.

[0205] En ciertas realizaciones, se selecciona una composición farmacéutica para liberación parenteral. En ciertas realizaciones, se selecciona una composición farmacéutica para inhalación o para liberación a través del tracto digestivo, tal como oralmente. Ciertas técnicas ejemplares para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables se encuentran dentro de las habilidades del experto en la técnica.

[0206] En ciertas realizaciones, los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En ciertas realizaciones, se utilizan soluciones amortiguadoras para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, típicamente dentro de un rango de pH desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8.

[0207] En ciertas realizaciones, cuando se contempla la administración parenteral, una composición farmacéutica puede estar en la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógeno, que comprende el anticuerpo deseado para ANGPTL4, con o sin agentes terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, un vehículo para inyección parenteral es el agua destilada estéril en la cual se formula el anticuerpo para ANGPTL4, sin o con al menos un agente terapéutico adicional, como una solución isotónica, estéril, adecuadamente preservada. En ciertas realizaciones, la preparación puede incluir la formulación de la molécula deseada con un agente, tales como microesferas inyectables, partículas bio-desgastables, compuestos poliméricos

(tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar la liberación controlada o sostenida del producto el cual puede entonces ser liberado vía una inyección de depósito. En ciertas realizaciones, también se puede utilizar el ácido hialurónico, y puede tener el efecto de promover la duración sostenida en la circulación. En ciertas realizaciones, pueden utilizarse dispositivos de liberación de fármaco implantables para introducir la molécula deseada.

[0208] En ciertas realizaciones, puede formularse una composición farmacéutica para inhalación. En ciertas realizaciones, puede formularse un anticuerpo para ANGPTL4, sin o con al menos un agente terapéutico adicional, como un polvo seco para inhalación. En ciertas realizaciones, puede formularse una solución para inhalación que comprende un anticuerpo para ANGPTL4, sin o con al menos un agente terapéutico adicional, con un propulsor para liberación en aerosol. En ciertas realizaciones, las soluciones pueden ser nebulizadas.

[0209] En ciertas realizaciones, puede administrarse una formulación oralmente. En ciertas realizaciones, un anticuerpo para ANGPTL4, sin o con al menos un agente terapéutico adicional, que se administra de esta manera puede formularse con o sin portadores comúnmente utilizados en la composición de formas de dosificación sólidas tales como tabletas y cápsulas. En ciertas realizaciones, puede diseñarse una cápsula para liberar la porción activa de la formulación en el punto en el tracto gastrointestinal cuando se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación pre-sistémica. En ciertas realizaciones, puede incluirse al menos un agente adicional para facilitar la absorción del anticuerpo para ANGPTL4 con o sin cualquier agente terapéutico adicional. En ciertas realizaciones, también pueden emplearse diluyentes, saborizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegrantes de tableta, y/o aglutinantes.

[0210] En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo para ANGPTL4, sin o con al menos un agente terapéutico adicional, en una mezcla con excipientes no tóxicos los cuales son adecuados para la fabricación de las tabletas. En ciertas realizaciones, para la disolución de las tabletas en agua estéril, u otro vehículo

apropiado, las soluciones pueden prepararse en forma de unidad de dosificación. Ciertos excipientes ejemplares incluyen, pero no están limitados a, diluyentes inertes (por ejemplo, carbonato de calcio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, lactosa, y fosfato de calcio); agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón, gelatina, y acacia); y agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico, y talco).

[0211] Las composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para aquellos expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que comprenden un anticuerpo para ANGPTL4, sin o con al menos un agente terapéutico adicional, en formulaciones de liberación sostenida o controlada. Ciertas formulaciones de liberación sostenida o controlada ejemplares incluyen, pero no están limitados a, portadores de liposomas, micropartículas biodesgastables, perlas porosas, e inyecciones de depósito. Ciertas técnicas ejemplares para la preparación de ciertas formulaciones son conocidas por aquellos expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices de polímero semipermeable en la forma de artículos formados, *por ejemplo* películas o microcápsulas. Ciertas matrices de liberación sostenida ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, poliésteres, hidrogeles, polilacturos (*ver, por ejemplo*, Patente U.S. No. 3,773,919 y EP 058,481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (*ver, por ejemplo*, Sidman *et al.* (1983) Biopolymers 22:547-556), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (*ver, por ejemplo*, Langer *et al.* (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 y Langer (1982) Chem. Tech. 12:98-105), etilen vinil acetato (Langer *et al.*, *supra*), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133,988). En ciertas realizaciones, las composiciones de liberación sostenida pueden incluir liposomas, los cuales pueden prepararse, en ciertas realizaciones, por cualquiera de los diversos métodos conocidos en el estado de la técnica. *Ver por ejemplo*, Eppstein *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692; EP 036,676; EP 088,046; y EP 143,949.

[0212] En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica a ser utilizada para administración *in vivo* es típicamente estéril. En ciertas realizaciones, esto se puede lograr por medio de filtración a través de membranas de filtración estériles. En ciertas realizaciones, donde la composición es liofilizada, la esterilización utilizando este método puede ser conducida bien sea antes de o después de la liofilización y reconstitución. En

ciertas realizaciones, la composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una solución. En ciertas realizaciones, las composiciones parenterales se ubican generalmente dentro de un contenedor que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

[0213] En ciertas realizaciones, una vez la composición farmacéutica ha sido formulada, puede almacenarse en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, o como un polvo deshidratado o liofilizado. En ciertas realizaciones, tales formulaciones pueden almacenarse bien sea en una forma lista para usar o en una forma (*por ejemplo*, liofilizada) que es reconstituida antes de la administración.

[0214] En ciertas realizaciones, se proporcionan kits para la producción de una unidad de administración de dosis única. En ciertas realizaciones, los kits pueden contener cada uno tanto un primer contenedor que tiene una proteína seca y un segundo contenedor que tiene una formulación acuosa. En ciertas realizaciones, se incluyen kits que contienen jeringas prellenadas de cámaras sencilla o múltiple (*por ejemplo*, jeringas líquidas y liojeringas).

[0215] En ciertas realizaciones, la cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para ANGPTL4, sin o con al menos un agente terapéutico adicional, a ser empleada terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y objetivos del tratamiento. Una persona experta en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento, de acuerdo con ciertas realizaciones, pueden por lo tanto variar dependiendo, en parte, de la molécula liberada, la indicación para la cual el anticuerpo para ANGPTL4, sin o con al menos un agente terapéutico adicional, está siendo utilizado, la ruta de administración, y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o condición (la edad y salud general) del paciente. En ciertas realizaciones, el médico clínico puede titular la dosificación y modificar la ruta de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. En ciertas realizaciones, una dosificación típica puede estar en el rango desde aproximadamente 0.1 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal del paciente, hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En ciertas realizaciones, la dosificación

puede estar en el rango desde 0.1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 5 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, incluyendo todos los puntos (incluyendo fracciones) entre cualquiera de los puntos finales precedentes. En ciertas realizaciones, la dosificación está entre aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 60 mg/kg de peso corporal. En ciertas realizaciones, la dosificación es aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 60 mg/kg de peso corporal.

[0216] En ciertas realizaciones, puede determinarse una dosificación adecuada con base en estudios animales, tales como aquellos proporcionados a continuación, por ejemplo, en las Partes VI.P, R, y T a Y.

[0217] En ciertas realizaciones, la frecuencia de dosificación tomará en consideración los parámetros farmacocinéticos de un anticuerpo para ANGPTL4 y, si es aplicable, de cualquiera de los agentes terapéuticos adicionales en la formulación utilizada. En ciertas realizaciones, un médico clínico administrará la composición hasta que se alcanza una dosificación que logra el efecto deseado. En ciertas realizaciones, la composición puede, por lo tanto, administrarse como una dosis sencilla, o como dos o más dosis (las cuales pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) durante el tiempo, o como una infusión continua vía un dispositivo de implantación o catéter. En ciertas realizaciones, un refinamiento posterior de la dosificación apropiada se hace rutinariamente por aquellos expertos en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas desarrolladas rutinariamente por ellos. En ciertas realizaciones, pueden comprobarse las dosificaciones apropiadas a través del uso de datos de respuesta a dosis. En ciertas realizaciones, un paciente recibe una dosis de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para ANGPTL4. En ciertas realizaciones, un paciente recibe una, dos, tres, o cuatro dosis por día de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para ANGPTL4. En ciertas realizaciones, un paciente recibe una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis dosis por semana de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para ANGPTL4. En ciertas realizaciones, un paciente recibe una o dos dosis por

mes de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para ANGPTL4.

[0218] En ciertas realizaciones, la ruta de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo oralmente, a través de inyección mediante rutas intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intra-parenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intra-ocular, intraarterial, intraportal, o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida o por medio de dispositivos de implantación. En ciertas realizaciones, las composiciones pueden administrarse por medio de inyección de bolo o continuamente mediante infusión, o mediante dispositivos de implantación.

[0219] En ciertas realizaciones, la composición puede administrarse localmente vía la implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el cual la molécula deseada ha sido absorbida o encapsulada. En ciertas realizaciones, donde se utiliza un dispositivo de implantación, puede implantarse el dispositivo dentro de cualquier tejido u órgano adecuado, y la liberación de la molécula deseada puede hacerse vía difusión, bolo de liberación controlada, o administración continua.

[0220] En ciertas realizaciones, puede ser deseable utilizar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para ANGPTL4, sin o con al menos un agente terapéutico adicional, en una forma *ex vivo*. En tales ciertas instancias, las células, tejidos y/u órganos que han sido removidos del paciente se exponen a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para ANGPTL4, sin o con al menos un agente terapéutico adicional, después de lo cual las células, tejidos y/u órganos son subsecuentemente implantados de vuelta en el paciente.

[0221] En ciertas realizaciones, se libera un anticuerpo para ANGPTL4, sin o con al menos un agente terapéutico adicional, por medio de la implantación de ciertas células que han sido genéticamente modificadas, utilizando métodos tales como aquellos aquí descritos, para expresar y secretar los polipéptidos. En ciertas realizaciones, tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas, o xenogeneicas. En ciertas realizaciones, las células pueden ser inmortalizadas. En ciertas

realizaciones, con el fin de disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de los tejidos circundantes. En ciertas realizaciones, los materiales de encapsulación son típicamente cerramientos o membranas poliméricas biocompatibles, semi-permeable que permiten la liberación del (los) producto(s) de proteína pero previenen la destrucción de las células por el sistema inmune del paciente o por medio de otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

H. Ciertos métodos de detección y diagnóstico

[0222] En ciertas realizaciones, los anticuerpos contra ANGPTL4 son utilizados para detectar la presencia de ANGPTL4 *in vivo* o *in vitro*. En ciertas realizaciones, el nivel de ANGPTL4 *in vivo* es correlacionado con una condición médica, tal como un trastorno del metabolismo de lípido, permitiendo de tal modo el diagnóstico de la condición médica. Ciertas condiciones médicas ejemplares que pueden diagnosticarse por medio de un anticuerpo contra ANGPTL4 se expusieron anteriormente.

[0223] Ciertos métodos de detección ejemplares son conocidos en el estado de la técnica e incluyen, pero no están limitados a, ELISA, radioinmunoensayo, inmunoelectrotransferencia, transferencia de tipo Western, inmunofluorescencia, e inmunoprecipitación. En ciertas realizaciones, los anticuerpos contra ANGPTL4 son modificados de tal forma que pueden ser detectados directamente, por ejemplo, mediante la unión del anticuerpo a un marcador. Ciertos marcadores ejemplares incluyen, pero no están limitados a, fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos, reactivos densos en electrones, enzimas, y ligandos. En ciertas realizaciones, los anticuerpos contra ANGPTL4 son detectados utilizando un anticuerpo "secundario" marcado que se enlaza a una clase de anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo de cabra anti-ratón).

I. Ciertos métodos de selección para antagonistas y agonistas de ANGPTL4

[0224] En ciertas realizaciones, se proporciona un método de selección para un agente que se enlaza a ANGPTL4. En ciertas realizaciones, un método de selección comprende la exposición de ANGPTL4 a uno o más agentes candidatos bajo condiciones adecuadas y la determinación de enlace

de ANGPTL4 a uno o más de los agentes candidatos. En ciertas realizaciones, un método de selección comprende la utilización de un anticuerpo contra ANGPTL4 en un ensayo de enlace competitivo. En tales ciertas realizaciones, se utiliza una primera mezcla de enlace que comprende un anticuerpo contra ANGPTL4 y ANGPTL4. Se mide la cantidad de enlace entre ANGPTL4 y el anticuerpo en la primera mezcla de enlace (M_0). También se utiliza una segunda mezcla de enlace que comprende el anticuerpo, ANGPTL4, y un agente a ser seleccionado. Se mide la cantidad de enlace entre ANGPTL4 y el anticuerpo en la segunda mezcla de enlace (M_1). La cantidad de enlace en la primera mezcla de enlace se compara con la cantidad de enlace en la segunda mezcla de enlace, por ejemplo, mediante el cálculo de la proporción M_1/M_0 . Se considera que un agente es capaz de enlazar ANGPTL4 si la cantidad de enlace de anticuerpo a ANGPTL4 en la segunda mezcla de enlace es menor que la cantidad de enlace de anticuerpo a ANGPTL4 en la primera mezcla de enlace. En ciertas realizaciones, un agente que se enlaza a ANGPTL4 disminuye el enlace del anticuerpo a ANGPTL4 en al menos aproximadamente 10% (esto es, $M_1/M_0 < 0.9$), en al menos aproximadamente 30% (esto es, $M_1/M_0 < 0.7$), en al menos aproximadamente 50% (esto es, $M_1/M_0 < 0.5$), en al menos aproximadamente 70% (esto es, $M_1/M_0 < 0.3$), en al menos aproximadamente 80% (esto es, $M_1/M_0 < 0.2$), en al menos aproximadamente 90% (esto es, $M_1/M_0 < 0.1$), o en al menos aproximadamente 95% (esto es, $M_1/M_0 < 0.05$).

[0225] En ciertas realizaciones, el ANGPTL4 a ser utilizado en cualquiera de los métodos de selección anteriormente descritos es el dominio de hélice enrollada del N terminal de ANGPTL4 o un fragmento del mismo. Con base en la observación del solicitante de que ciertos anticuerpos que se enlazan dentro del dominio de hélice enrollada del N terminal ANGPTL4 tienen actividad neutralizante (ver a continuación, Parte VI.L. y VI.P.), un agente (por ejemplo, un anticuerpo o un agente no anticuerpo) identificado mediante un método de selección como enlazante al dominio de hélice enrollada del N terminal ANGPTL4 en un candidato de actividad antagonista de ANGPTL4. En ciertas realizaciones, la actividad antagonista se verificó demostrando que el antagonista candidato neutraliza ANGPTL4 en un ensayo *in vivo* o *in vitro*, tal como aquellos descritos en la Parte VI.D. y VI.I. En ciertas realizaciones, se utilizan los antagonistas de ANGPTL4 en el tratamiento de trastornos del metabolismo de lípido.

[0226] En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos de selección para agentes que se enlazan al dominio del fibrinógeno de ANGPTL4. Con base en la observación del solicitante de que un anticuerpo (6G11) que se enlaza dentro del dominio del fibrinógeno de ANGPTL4 mejora la actividad ANGPTL4 (ver Parte VI.L., VI.P), un agente (por ejemplo, un anticuerpo o un agente no anticuerpo) identificado mediante un método de selección como enlazante al dominio del fibrinógeno de ANGPTL4 es un candidato de actividad agonista de ANGPTL4. En ciertas realizaciones, la actividad agonista se verificó demostrando que el agonista candidato mejora ANGPTL4 en un ensayo *in vitro*, tal como el ensayo descrito en la Parte VI.I., o administrando el agonista candidato *in vivo* y evaluando para niveles incrementados de uno o más lípidos en suero. En ciertas realizaciones, se utilizan los agonistas de ANGPTL4 en el tratamiento de ciertos trastornos relacionados con la pérdida excesiva de peso, tales como la anorexia nervosa, bulimia nervosa y la caquexia (pérdida) asociada con enfermedades tales como cáncer, fibrosis quística, y SIDA.

[0227] Ciertos agentes ejemplares que pueden seleccionarse para enlazar a ANGPTL4 incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos, moléculas pequeñas (*por ejemplo*, compuestos orgánicos, compuestos organometálicos, sales de compuestos orgánicos y organometálicos, sacáridos, aminoácidos, nucleósidos, y nucleótidos), aptámeros, péptidos, y péptidos miméticos. Ciertos péptidos ejemplares incluyen péptidos soluble, los cuales incluyen, pero no están limitados a, miembros de genotecas de péptido aleatorio (ver, *por ejemplo*, Lam *et al.* (1991) Nature 354:82-84; Houghten *et al.* (1991) Nature 354:84-86) y miembros de genotecas moleculares derivadas de química combinatorial hechas de aminoácidos de configuración D- y/o L-; y fosfopéptidos, los cuales incluyen, pero no están limitados a, miembros de genotecas dirigidas a fosfopéptido aleatorio o parcialmente degenerado (ver, *por ejemplo*, Songyang (1993) Cell 72:767-778).

[0228] En ciertas realizaciones, el modelamiento por computadora y las tecnologías de búsqueda permiten la identificación de compuestos, o el mejoramiento de compuestos ya identificados, que enlazan ANGPTL4. Ciertos sistemas de modelamiento molecular ejemplares incluyen, pero no están limitados a, los programas CHARMM y QUANTA (Poligen Corporación,

Waltham, MA). CHARMM desarrolla las funciones de minimización de energía y dinámica molecular. QUANTA desarrolla la construcción, modelamiento gráfico y análisis de la estructura molecular. QUANTA permite la construcción, modificación, visualización, y análisis interactivo del comportamiento de las moléculas con las demás.

J. Antagonistas de ácido nucleico de ANGPTL4

[0229] En ciertas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que disminuye la expresión de un ácido nucleico que codifica ANGPTL4. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico que codifica ANGPTL4 codifica ANGPTL4 de ratón. En ciertas realizaciones, el nucleico que codifica ANGPTL4 codifica ANGPTL4 humana. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico aislado es un ácido nucleico de antisentido. En tales ciertas realizaciones, el ácido nucleico de antisentido es una molécula de ADN de cadena sencilla que promueve la degradación de un ARNm objetivo por medio de un mecanismo basado en ARNseH. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico de antisentido es un oligonucleótido de aproximadamente 8-30 nucleótidos de longitud (incluyendo todos los puntos entre los puntos finales). En ciertas realizaciones, un ácido nucleico de antisentido es un oligonucleótido de aproximadamente 18-26 nucleótidos de longitud.

[0230] En ciertas realizaciones, un ácido nucleico de antisentido abarca una molécula de ARN que reduce la expresión de una ácido nucleico objetivo por medio de un mecanismo basado en ARN de interferencia (ARNi). Ciertas moléculas de ARN ejemplares adecuadas para ARNi incluyen, pero no están limitadas a, ARNs de interferencia cortos (ARNsis), microARNs (ARNms), ARNs no codificantes minúsculos (ARNtncs), y ARN modulador pequeño (ARNsm). Para revisión de ciertos mecanismos de ARNi ejemplares y moléculas de ARN para uso en ARNi, *ver, por ejemplo*, Novina et al. (2004) Nature 430:161-164.

[0231] En ciertas realizaciones, se proporciona un ARNsi que disminuye la expresión de un ácido nucleico que codifica ANGPTL4. En ciertas realizaciones, un ARNsi es un oligonucleótido de aproximadamente 18-26 nucleótidos de longitud (incluyendo todos los puntos entre los puntos finales). En ciertas realizaciones, un ARNsi es un oligonucleótido de aproximadamente

20-24 nucleótidos de longitud, o un oligonucleótido de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, un ARNsi es ARN de cadena doble. En ciertas realizaciones, un ARNsi inducirá la degradación de una molécula de ARNm objetivo que es complementaria a la cadena en antisentido del ARNsi. *Ver, por ejemplo*, Novina et al. (2004) Nature 430:161-164.

[0232] La actividad de un ácido nucleico de antisentido, tal como una molécula de ADN de antisentido o un ARNsi, se afecta a menudo por la estructura secundaria del ARNm objetivo. *Ver, por ejemplo*, Vickers et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:7108-7118. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se selecciona un ácido nucleico de antisentido que es complementario a una región de un ARNm objetivo que está disponible para apareamiento de bases. En ciertas realizaciones, una región adecuada de un ARNm objetivo se identifica desarrollando un "gene walk" por ejemplo, evaluando empíricamente un número de oligonucleótidos de antisentido por su capacidad para hibridizar en varias regiones a lo largo de un ARNm objetivo y/o para reducir la expresión de un ARNm objetivo. *Ver, por ejemplo*, Vickers et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:7108-7118; Hill et al. (1999) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 21:728-737. En ciertas realizaciones, una región adecuada de un ARNm objetivo se identifica utilizando un programa de predicción de estructura secundaria del ARNm o un algoritmo relacionado para identificar regiones de un ARNm objetivo que no hibridizan en cualquiera otra de las regiones del ARNm objetivo. *Ver, por ejemplo*, Hill et al. (1999) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 21:728-737. En ciertas realizaciones, se utiliza una combinación de ambos los métodos anteriores para identificar una región adecuada de un ARNm objetivo. *Ver por ejemplo*, Hill et al. (1999) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 21:728-737.

[0233] En ciertas realizaciones, se proporciona un método de reducción de la actividad ANGPTL4 reduciendo la expresión de un ácido nucleico que codifica ANGPTL4. En ciertas realizaciones, el método comprende la reducción de la expresión de un ácido nucleico que codifica ANGPTL4 en un célula *in vitro* o *in vivo*. En ciertas realizaciones, el método comprende la administración de un ácido nucleico de antisentido que reduce la expresión de un ácido nucleico que codifica ANGPTL4 para una célula *in vitro* o *in vivo*. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico que codifica ANGPTL4 codifica ANGPTL4 humano. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico que codifica ANGPTL4 codifica ANGPTL4 de ratón.

[0234] En ciertas realizaciones, se proporciona un método para el tratamiento de un trastorno del metabolismo de lípido, tal como cualquiera de aquellos descritos anteriormente (Parte V.G.). En ciertas realizaciones, el método comprende la administración a un paciente de una cantidad efectiva de un ácido nucleico de antisentido que reduce la expresión de un ácido nucleico que codifica ANGPTL4. En ciertas realizaciones, se libera el ácido nucleico de antisentido a un órgano que expresa un ácido nucleico que codifica ANGPTL4. Ciertos estudios han mostrado que se induce ANGPTL4 bajo condiciones de ayuno en el hígado, la pituitaria, y el tejido adiposo. Ge et al. (2004) J. Lipid Res. 45:2071-2079. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se libera un ácido nucleico de antisentido en el hígado, la pituitaria, o el tejido adiposo. Ciertas guías ejemplares para la administración *in vivo* de ácido nucleicos de antisentido y la liberación sostenida del de ácido nucleicos de antisentido *in vivo*, incluyendo liberación sostenida a órganos específicos tales como el hígado, se proporcionan, por ejemplo, en Khan et al. (2004) J. Drug Targeting 12:393-404. En ciertas realizaciones, se alcanza la liberación sostenida mediante la administración de ácido nucleico de antisentido que está encapsulado o contenido d cualquier otra forma mediante un polímero biodegradable. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el ácido nucleico de antisentido puede estra contenido dentro de microesferas de poli(ácido glicólico) (PLGA) (por ejemplo, 0.5-20 µm; 3000 MW). En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de antisentido está conjugado con una mitad lipofílica. Ver Khan et al. (2004) J. Drug Targeting 12:393-404.

VI. Ejemplos

A. Cuidado de ratón y estudios dietéticos

[0235] Los estudios de ratón se desarrollaron de acuerdo con las guías federales. Los ratones se encerraron a 24°C en un ciclo fijo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad y tuvieron acceso *ad libitum* agua y chow de roedor (22% de calorías de la grasa) (producto no. 5001; Purina, St. Louis, MO) o dieta alta en grasa (60% de calorías de la grasa) (producto no. D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ.) tal como se indica a continuación. Los ratones que fueron alimentados HFD recibieron esa dieta desde la edad de 4-5 semanas en

117

adelante. Los ratones referidos a continuación como los que están en el “estado de ayuno” fueron privados de alimento durante 16 horas.

B. La sobreexpresión *in vivo* de ANGPTL4 causó hiperlipidemia

1. Sobreexpresión de ANGPTL4 de ratón

[0236] Se insertó ADNc que codifica ANGPTL4 de ratón de longitud completa (SEQ ID NO:1) dentro de la región suprimida de Ad E1 del vector de adenovirus pFAD, colocando de este modo el ADNc bajo el control del promotor de citomegalovirus. Ver Hitt et al., “Construction and propagation of human adenovirus vectors,” en Cell Biology: A Laboratory Handbook Vol. 1, pp. 500-512 (J.E. Celis, ed., 2nd ed. 1998). Se utilizó la construcción resultante, Ad5-mAngptl-4T, para infectar células CHO. Como un control, se insertó ADNc que codifica β -galactosidasa dentro de la región suprimida de Ad E1 del vector de adenovirus pFAD, colocando de este modo el ADNc bajo el control del promotor de citomegalovirus. También se utilizó la construcción resultante, Ad5- β -gal, para infectar células CHO. Se confirmó la expresión de tanto el ADNc de ANGPTL4 de ratón o el ADNc de β -galactosidasa por medio de transferencia de tipo Western de extractos de célula CHO infectada.

[0237] Se inyectó Ad5-mAngptl-4T o Ad5- β -gal a 5×10^{10} vp en ratones C57BL/6J vía la vena de la cola. Se recolectaron muestras de sangre de los ratones infectados con adenovirus en diversos puntos de tiempo después de la infección. Se midieron los niveles en suero de triglicérido y colesterol utilizando el Cobas Integra 500 (Roche, Basel, Switzerland). Se midieron los niveles en suero de ácido graso libre (FFA) utilizando el kit NEFA C (99475409, Wako, Richmond, VA).

[0238] Tal como se muestra en Figuras 1A, 1B, y 1C, los ratones inyectados con Ad5-mAngptl-4T (cuadros rellenos) mostraron niveles incrementados en suero en ayuno de triglicéridos, colesterol total, y ácido graso libre (FFA) con relación a los ratones de control inyectados con Ad5- β -gal (cuadros abiertos). Específicamente, los niveles en suero en ayuno de triglicéridos y FFA en ratones inyectados con Ad5-mAngptl-4T aumentaron dentro de los dos días después de la inyección y alcanzaron un pico después de 4 días (Figuras 1A y 1C). En el día 4, el triglicérido se incrementó en aproximadamente 18 veces, y los FFA en aproximadamente 9 veces, en los

ratones inyectados con Ad5-mAngptl-4T en relación con los ratones de control. El nivel en suero en ayuno de colesterol total también se incrementó significativamente en los ratones inyectados con Ad5-mAngptl-4 en relación con los ratones de control (Figura 1B). También se muestran los niveles de triglicérido y colesterol en suero de ayuno tres días después de la inyección con bien sea Ad5-mAngptl-4T o Ad5- β -gal en las Figuras 2 y 3.

2. Sobreexpresión de ANGPTL4 humano

[0239] Para determinar los efectos de ANGPTL4 humano en ratones, se sobreexpresó ANGPTL4 humano en ratones de tipo nativo. Se insertó ADNc que codifica ANGPTL4 humano de longitud completa (SEQ ID NO:2) dentro de la región suprimida de Ad E1 del vector de adenovirus pFAD, colocando de este modo el ADNc bajo el control del promotor de citomegalovirus. Se inyectó la construcción resultante, Ad5-hAngptl4T, o la construcción de control, Ad5- β -gal, a 5×10^{10} vp dentro de la vena de la cola de ratones C57BL/6J. Se midieron los niveles en suero de triglicérido y colesterol cuatro días después de la inyección. Tal como se muestra en las Figuras 4 y 5, el ANGPTL4 humano elevó significativamente los niveles de triglicérido y colesterol en suero en ayuno con relación al constructo de control. El ANGPTL4 humano no tuvo efecto sobre los niveles de glucosa en los ratones en este estudio. (Datos no mostrados.) Estos resultados demuestran que el ANGPTL4 humano es capaz de elevar los niveles de lípido en suero en ayuno en ratones en forma similar al ANGPTL4 de ratón.

C. Ratones carentes (knockout) de Angptl4 tuvieron niveles en suero de lípido reducidos

[0240] La Angptl4 fue "eliminado - knocked out" en ratones para determinar si la carencia de ANGPTL4 tendría el efecto opuesto en los niveles en suero de lípido como la sobreexpresión de ANGPTL4 (p.e., para determinar si la carencia de ANGPTL4 disminuiría los niveles en suero de lípido). Para eliminar la Angptl4 en los ratones, se inyectó un clon de célula ES con un vector retroviral insertado en los puntos de Angptl4 en blastocitos hospederos C57BL/6-Tyr^{c-Brd}. Ver Zambrowicz et al. (1998) Nature 392:608-611. Los ratones quiméricos fueron generados y propagados en ratones C57BL/6-Tyr^{c-Brd}. La prole Angptl4^{+/-} resultante fue cruzada para producir ratones Angptl4^{-/-}.

El ADN de la cola fue genotipado mediante transferencia en mancha cuantitativa (Bio-Rad, Hercules, CA) usando el fragmento de gen de neomicina fosfotransferasa y un fragmento que contiene exón 1 del gen Csk murino (MMU05247) como sondas para detectar la integración del virus y un gen endógeno de copia única, respectivamente.

[0241] Los ratones carentes (knockout) tenían viabilidad moderadamente reducida, como se muestra en la Figura 29. Adicionalmente, se encontró que algunas crías tienen un abdomen distendido y linfangiectasia intestinal antes del destete.

[0242] En adición, los ratones carentes (knockout) (knockout) alimentados con una dieta alta en grasa (HFD) tenían menores tasas de supervivencia que los ratones tipo nativo alimentados con HFD. Ver Figura 30. Se encontró que algunos ratones carentes (knockout) muertos tenían abdomenes distendidos, y se encontró que algunos tenían inflamación crónica y/o macrófagos repletos de lípido en sus ganglios linfáticos mesentéricos. En adición, se encontró que algunos ratones tenían linfáticos dilatados.

[0243] Para evaluar el efecto de la deficiencia de Angptl4 en los niveles de lípido en suero en ratones alimentados con una dieta estándar ("chow"), los niveles de triglicérido y colesterol en suero fueron examinados en los estados de alimentado y en ayuno de ratones carentes (knockout) (knockout) y ratones tipo nativo. Los resultados se muestran en la Figura 6 ("n" indica el número de ratones usados). Los niveles de triglicérido en suero de ratones carentes (knockout) ("HOM") en el estado en ayuno fueron 70% más bajos que los niveles de triglicérido en suero en ratones tipo nativo en el estado de ayuno (Figura 6A). Los niveles de colesterol total en suero y niveles de ácido graso libre en suero (FFA) en ratones carentes (knockout) en el estado de ayuno fueron también significativamente menores que los niveles de colesterol total en suero y ácido graso libre en suero (FFA) en ratones tipo nativo en el estado de ayuno (Figura 6B y 6C).

[0244] La Figura 25, panel A, muestra los niveles en suero en ayuno de triglicérido, colesterol total, lipoproteína de alta densidad (HDL), y lipoproteína de baja densidad (LDL) en ratones machos tipo nativo, heterocigóticos, y carentes alimentados con una dieta estándar ("chow"). Los niveles de

triglicérido en suero en ayuno para ratones macho heterocigóticos fueron 41% menores que para ratones macho tipo nativo en ese experimento. Los niveles de triglicérido en suero en ayuno para ratones macho carentes (knockout) fueron 59% menores que para ratones macho tipo nativo en ese experimento. Los niveles de colesterol total en ayuno para ratones macho heterocigóticos y carentes (knockout) fueron 10% y 21% menores, respectivamente, que para los ratones machos tipo nativo en ese experimento.

[0245] La Figura 25, panel B, muestra los niveles en suero en ayuno de triglicérido, colesterol total, lipoproteína de alta densidad (HDL), y lipoproteína de baja densidad (LDL) en ratones hembra tipo nativo y carentes (knockout), alimentados con una dieta estándar ("chow"). Los niveles de triglicérido en suero en ayuno para ratones hembra carentes (knockout) fueron 27% menores que para ratones hembra tipo nativo en ese experimento. Los niveles de colesterol total en ayuno para ratones hembra carentes (knockout) fueron 33% menores que para hembras de ratones macho tipo nativos en ese experimento. Los niveles de HDL en ayuno para ratones carentes (knockout) hembra fue 31% menos que para ratones hembra tipo nativo en ese experimento.

[0246] También se examinaron los efectos de la deficiencia de *Angptl4* en los niveles de lípido en suero de ratones carentes (knockout) y ratones tipo nativo con obesidad inducida por dieta (DIO). Ratones carentes (knockout) y ratones tipo nativo fueron alimentados con una dieta alta en grasa (HFD) para inducir DIO. Los niveles de lípido en suero en estos ratones fueron entonces examinados en los estados de alimentación y ayuno. Como se muestra en las Figuras 6A y 6B, los niveles en suero de triglicéridos en colesterol total fueron significativamente reducidos en ratones carentes (knockout) en ambos estados de alimentación y de ayuno. Adicionalmente, los niveles de FFA también fueron significativamente reducidos en ratones carentes (knockout) en el estado de ayuno. Ver Figura 6C.

[0247] La Figura 26 muestra los niveles en suero en ayuno de triglicérido, colesterol total, HDL, y LDL en ratones macho tipo nativo y carentes (knockout) alimentados con una dieta alta en grasa (HFD). En ese experimento, los niveles en suero de triglicérido en ratones macho carentes (knockout) alimentados con una dieta HFD fueron 77% menores que en ratones tipo nativo alimentados con HFD. El nivel de colesterol total en ayuno

en ratones macho carentes (knockout) alimentados con una dieta HFD fue 35% menor que en ratones tipo nativo alimentados con HFD en ese experimento.

[0248] Adicionalmente, los ratones carentes (knockout) fueron protegidos de DIO hasta un grado significativo. Los ratones tipo nativo alimentados con HFD desarrollaron obesidad marcada en comparación con ratones tipo nativo en una dieta estándar. Ver Figuras 7A y 7B. Sin embargo, la ganancia de peso corporal y ganancia de grasa corporal fueron significativamente disminuidas para ratones carentes (knockout) de *Angptl4* alimentados con estándar o HFD. Ver Figuras 7A-7D. La mayoría del peso corporal disminuido se atribuye a una disminución en la cantidad de grasa corporal y no una disminución de la masa corporal magra.

[0249] La Figura 27, panel A, muestra los gramos totales de grasa corporal en ratones machos tipo nativo ("WT") y carentes (knockout) ("Hom") alimentados con una dieta alta en grasa (HFD). Los ratones macho carentes (knockout) alimentados con HFD tenía significativamente menor grasa corporal que los ratones machos de tipo nativo alimentados con HFD. La Figura 27, panel B, muestra los gramos totales de grasa corporal en el tiempo en ratones hembra tipo nativo ("WT") y carentes (knockout) ("Hom") alimentados con HFD. Ese experimento muestra una tendencia hacia menor grasa corporal en los ratones hembra carentes (knockout) alimentados con HFD versus los ratones hembra tipo nativo alimentados con HFD.

[0250] Los ratones macho carentes (knockout) alimentados con HFD tenían similar ingesta de alimento que los ratones macho tipo nativo alimentados con HFD. Ver Figura 28, panel A. Los ratones macho carentes (knockout) alimentados con HFD también tenían niveles similares de contenido de grasa fecal que los ratones macho tipo nativo alimentados con HFD. Ver Figura 28, panel B.

[0251] En general, estos resultados mostraron que la deficiencia de *Angptl4* disminuyó los lípidos en suero y confirieron protección contra la obesidad.

D. Los ratones carentes (knockout) de Angptl4 no mostraron actividad de LPL adipocito disminuida en el estado de ayuno

[0252] Se examinó la actividad de LPL endógena en tejido adiposo (tejido de cojín de grasa epidídimo) de ratones tipo nativo y carentes (knockout) en los estados alimentado y de ayuno. Las muestras de tejido (0.3 – 1.0 g) fueron homogenizadas en amortiguador de homogenización enfriado con hielo (NH_3 0.025 M (pH 8.2), 1 mg/ml de BSA, EDTA 5 mM, heparina 5 IU/ml, y coctel inhibidor de proteasa) usando un homogenizador Kinematica. Siguiendo la centrifugación a 3,000 g por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante fue recolectado.

[0253] Se midió la actividad de LPL en el sobrenadante mediante la cantidad de ácido oléico liberado del sustrato, glicerol-tri[9,10(n)- ^3H]oleato, con base en el ensayo de Bergö et al. (1996) Biochem. J. 313:893-898). Se agregaron 100 μl de sobrenadante a un volumen igual de solución de sustrato (glicerol tri[9,10(n)- ^3H]oleato 2 mM (131 kbeq/ μmol), 189 ng/ml de L- α -fosfatidilcolina, 14 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), Tris 140 mM -HCl (pH 8.0), 15% de glicerol, y 10% de suero bovino fetal inactivado al calor) por 1 hora a 37°C. La reacción fue detenida mediante la adición de 3.25 ml de mezcla de metanol/cloroformo/hexano (141:125:100, v/v/v) y 1.05 ml de amortiguador de K_2CO_3 -ácido bórico 0.1 M (pH 10.5). Seguido de vorticeado vigoroso y separación centrífuga a 3,000 g por 15 minutos a temperatura ambiente, se determinó la cantidad de ^3H en alícuotas de 1 ml aliquots de la fase acuosa/metanol usando un contador de cintilación líquido Beckman Coulter LS6500.

[0254] En ratones tipo nativo, la actividad de LPL endógena disminuyó significativamente en el estado de ayuno con relación a actividad de LPL endógena en el estado alimentado. Ver Figura 8. Este resultado fue consistente con observaciones previas que la expresión de ANGPTL4 es inducida en el estado alimentado, disminuyendo así la actividad de LPL. Ver, p.e., Ge et al. (2004) J. Lipid Res. 45:2071-2079. Sin embargo, en ratones carentes (knockout), la actividad de LPL endógena no disminuyó en el estado de ayuno con relación a la actividad de LPL endógena en el estado alimentado. Ese resultado fue consistente con la ausencia de ANGPTL4 en ratones carentes (knockout).

E. Los ratones carentes (knockout) de Angptl4 fueron protegidos de esteatosis hepática (hígado graso)

[0255] La HFD ha estado asociada con la esteatosis hepática (hígado graso). Para determinar si la deficiencia de Angptl4 protege contra la esteatosis hepática inducida por HFD, se usó la espectroscopía de resonancia magnética de protón localizada (MRS) para medir los niveles de lípido en hígados de ratones de tipo nativo y carentes (knockout) en HFD y dieta estándar. Se evaluaron la concentración de grasa en hígado y el grado de infiltración grasa.

[0256] La MRS *in vivo* se realizó usando un sistema PharmaScan de 7 Teslas, 16 cm de diámetro (Bruker BioSpin, Billerica, MA) usando una bobina de jaula de pájaro con diámetro interno de 38 mm para transmisión y recepción de radio-frecuencia. Los ratones fueron anestesiados con 1.5-2% de isoflurano manteniendo su temperatura corporal mediante un sistema de circulación de agua pre-calentada dentro del imán. Se monitoreó constantemente su actividad respiratoria. El volumen de interés (VOI) fue seleccionado con base en una serie de imágenes Scout T1 que cubren el hígado entero y evitando cuidadosamente los vasos y tejidos adiposos. La ^1H -MRS localizada se obtuvo usando una secuencia PRESS (TE = 28 ms, TR = 1.0 s, 196 promedios, supresión de agua: apagado, VOI: $1.8 \times 1.8 \times 1.8 \text{ mm}^3$, o $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}$) con sincronización respiratoria. Se usó la integral del área bajo los picos de agua y grasa para calcular el contenido de grasa (% de grasa). Ver Thomsen et al. (1994) Magnetic Resonance Imaging 12:487-495.

[0257] Hígados de ratones tipo nativo en HFD mostraron niveles de lípido significativamente mayores con relación a hígados de ratones tipo nativo en dieta estándar ("chow"). Ver Figura 9A. Sin embargo, los hígados de ratones carentes (knockout) ("HOM") en HFD no mostraron niveles de lípido significativamente aumentados con relación a hígados de ratones carentes (knockout) en dieta estándar. Además, los hígados de ratones (knockout) en HFD mostraron niveles de lípido significativamente menores con relación a hígados de ratones tipo nativo en HFD. Consistente con estos resultados, la tinción de Rojo aceite O de secciones de hígado de ratones carentes (knockout) en HFD reveló número y tamaño significativamente reducido de

gotas de lípido con relación a secciones de hígado de ratones tipo nativo en HFD. Ver Figura 9B. Más aún, el número y tamaño de gotas de lípido en secciones de hígado de ratones carentes (knockout) en HFD se asemejó a la de los ratones tipo nativo en dieta estándar. Estos resultados indicant que los ratones deficientes de Angptl4 estaban protegidos contra la esteatosis hepática inducida por HFD.

[0258] El contenido de lípido intramiocelular (IMCL) de músculo esquelético también fue medido en ratones carentes (knockout) y tipo nativo para determinar si este tejido, como el hígado, estaba protegido de la acumulación de lípido en ratones carentes (knockout). Para la determinación del contenido de lípido intramiocelular, los estudios de MRS *in vivo* se realizaron en un sistema PharmaScan 7 Tesla de 16 cm de diámetro usando una bobina de jaula de pájaro con diámetro interno de 19 mm para la transmisión y recepción de radio-frecuencia. Los ratones fueron anestesiados con 1.5-2% de isoflurano, como se describió anteriormente, y se colocaron dentro de la bobina con sus patas traseras alineadas a lo largo del eje longitudinal del imán. Se seleccionó el volumen de interés (VOI) de 1.5X1.5X1.5 mm³ en el M. tibial anterior izquierdo o derecho, evitando las estructuras vasculares y depósitos de tejido adiposo bruto. La ¹H-MRS localizada se obtuvousando una secuencia PRESS (TE = 16 ms, TR= 2.0 s, 292 promedios, suppression de agua CHESS), para asegurar que los picos de IMCL y lípido extramiocelular (EMCL) eran claramente distintos en el espectro. La integral del área bajo los picos de ICML y tCr (creación total) se usó para calcular el contenido de ICML (la relación ICML/tCr). (Las concentraciones tCr para el M. tibial anterior en ratas ZDF obesas a 8 semanas y 15 meses de edad fueron de 136+/-2.2 y 132+/-1.0 µmol/g de peso seco, respectivamente. Ver Kuhlmann et al. (2003) Diabetes 52:138-44.)

[0259] Los ratones carentes (knockout) en HFD mostraron contenido de lípido intramiocelular significativamente menor que los ratones tipo nativo en HFD. Ver Figura 10. Así, la deficiencia de Angptl4 protegió tejidos importantes, tales como hígado y músculo esquelético, de la acumulación de lípido.

F. Los ratones carentes de Angptl4 estaban protegidos de la intolerancia a la glucosa

[0260] Se conoce que los niveles mayores de contenido lípido hepático e intramiocelular están asociados con la insensibilidad a la insulina. En adición, se conoce que la HFD está asociada con la intolerancia a la glucosa. Para determinar si la deficiencia de Angptl4 protegía contra estos efectos, se examinaron los niveles en suero de glucosa e insulina en ratones de tipo nativo y carentes (knockout).

[0261] Los ratones de tipo nativo y carentes (knockout) fueron alimentados con HFD. Después de 16 horas de ayuno, se midió la glucosa en sangre mediante Accu-Check Advantage (2138930, Roche, Indianapolis, IN). Inmediatamente después se administraron 2 g de glucosa/kg peso corporal mediante gavaje oral en una solución de glucosa estéril al 20%. La glucosa en sangre fue posteriormente medida a varios puntos de tiempo. Ver Figura 11, panel C. En ese experimento, los ratones carentes (knockout) alimentados con HFD fueron más tolerantes a la glucosa que los ratones tipo nativo alimentados con HFD, lo que significa que los ratones carentes (knockout) que reciben un gavaje oral de 2 g de glucosa/kg de peso corporal tenían menores niveles de glucosa en sangre en el tiempo que los ratones tipo nativo que reciben el mismo tratamiento. Ese resultado fue estadísticamente significativo.

[0262] Los ratones tipo nativo y carentes (knockout) fueron alimentado con HFD. Después de 6 horas de ayuno al inicio del ciclo de luz, se midió la glucosa en sangre. Inmediatamente después se inyectaron 750 mU/kg de peso corporal de insulina (Humulin R, Eli Lilly) intraperitonealmente usando una solución de insulina de 75 mU/ml. La glucosa en sangre fue posteriormente medida en varios puntos de tiempo. Ver Figura 11, panel D. En ese experimento, los ratones carentes (knockout) alimentados con HFD fueron más sensibles a la insulina que los ratones tipo nativo alimentados con HFD, lo que significa que la inyección de 75 mU/ml de insulina produjo menores niveles de glucosa en el tiempo que los ratones tipo nativo que recibieron el mismo tratamiento. Ese resultado fue estadísticamente significativo.

[0263] Los niveles en suero de glucosa e insulina en ayuno en ratones tipo nativo con HFD fueron significativamente mayores que aquellos en ratones

tipo nativo en dieta estándar, indicando hiperglucemia e hiperinsulinemia inducida por HFD. Ver Figura 11, paneles A y B. Sin embargo, los niveles en suero en ayuno de glucosa e insulina en ratones carentes (knockout) en HFD no fueron significativamente diferentes de los niveles en ratones tipo nativo o carentes (knockout) alimentados con una dieta estándar, indicando que la deficiencia de Angptl4 produjo la protección de la hiperglucemia e hiperinsulinemia inducida por HFD. Ver Figura 11, páneles A y B.

G. Sobreexpresión de ANGPTL4 de ratón elevó los niveles de lípido en suero en ratones carentes (knockout)

[0264] Para determinar si la sobreexpresión de ANGPTL4 de ratón podría recuperar cualquiera de los fenotipos de ratones carentes (knockout) de Angptl4, se inyectó la construcción Ad5-mAngptl-4T (descrita anteriormente, Parte VI.B.1.) a 5×10^{10} vp en la vena de la cola de ratones carentes (knockout). Como un control, la construcción Ad5- β -gal (descrita anteriormente, Parte VI.B.1.) fue inyectada a 5×10^{10} vp en la vena de la cola de ratones carentes (knockout). Tres días después de la inyección, los ratones carentes (knockout) inyectados con la construcción Ad5-mAngptl-4T mostraron niveles significativamente mayores en suero en ayuno de triglicéridos y colesterol que los de ratones carentes (knockout) inyectados con una construcción de control. Ver Figuras 12 y 13. De hecho, los niveles de triglicéridos y colesterol en ratones carentes (knockout) inyectados con la construcción Ad5-mAngptl-4T fueron comparables a aquellos en ratones tipo nativo inyectados con la construcción Ad5-mAngptl-4T. Comparar las Figuras 12 y 13 con Figuras 2 y 3. Aquellos resultados demostraron que la sobreexpresión de ANGPTL4 de ratón revirtió los niveles en suero de lípido de los ratones carentes (knockout) de Angptl4.

H. Producción y purificación de ANGPTL4 de ratón

[0265] Para expresar la ANGPTL4 recombinante, células CHO fueron infectadas con 1.5×10^{11} vp de adenovirus recombinante Ad5-mAngptl-4T (descrito anteriormente, Parte VI.B.1.). El medio fue cambiado a medio libre de suero (medio de CHO EX-CELL 325-PF, 14335, JRH, Lenexa, KS) 16-24 horas después. El medio acondicionado fue cosechado y luego reemplazado con medio libre de suero fresco cada 24-36 horas para un total de 5 cosechas.

[0266] El medio acondicionado (1 L) fue cargado en una columna de 10-12 ml de Resina Quelante de Níquel (R801-01, Invitrogen, Carlsbad, CA). La columna fue lavada con 5 volúmenes de columna de amortiguador de lavado (imidazol 10 mM, Tris 20 mM pH 7.8, NaCl 500 mM). El ANGPTL4 enlazado fue eluido con amortiguador de elusión (imidazol 500 mM, Tris 20 mM pH 7.8, NaCl 500 mM) y recolectado en una serie de fracciones de 1.5 ml. La presencia de ANGPTL4 en las fracciones recolectadas se determina mediante transferencia del tipo western y simplemente tinción azul. Las fracciones que contienen ANGPTL4 fueron recolectadas juntas, alicuotadas, y congeladas a -70°C.

I. Inhibición de la actividad de LPL por ANGPTL4

[0267] Se determinó el efecto del ANGPTL4 de ratón en la actividad de LPL usando un ensayo *in vitro*. La actividad de LPL se midió mediante la cantidad de ácido oléico liberado de un sustrato, glicerol-tri[9,10(n)-³H]oleato, de la siguiente manera (con base en el método de Shimizugawa et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:33742-33748).

[0268] Una solución de LPL bovina reconstituida (L2254, Sigma, St. Louis, MO) fue incubada con un volumen igual de solución de sustrato (glicerol tri[9, 10 (n)-³H]oleato 2 mM (131 kbeq/μmol), 189 ng/ml de L-α-fosfatidilcolina, 14 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), Tris 140 mM -HCl (pH 8.0), 15% de glicerol, y 10% de suero bovino fetal inactivado al calor) en la presencia de 0 a 400 nM de ANGPTL4 de ratón (producido como se describió anteriormente, Parte VI.H.) por 1 hora a 37°C. La reacción fue detenida por la adición de 3.25 ml de mezcla de metanol/cloroformo/hexano (141:125:100, v/v/v) y 1.05 ml de amortiguador de K₂CO₃-ácido bórico 0.1 M (pH 10.5). Seguido del vorticeado vigoroso y separación centrífuga a 3,000 g por 15 minutos a temperatura ambiente, se determinó la cantidad de ³H en alícuotas de 1 ml de la fase acuosa/metanol usando un contador de cintilación líquido Beckman Coulter LS6500. Una unidad de actividad de LPL se definió como la liberación de 1 μmol de ácido oléico marcado ³H por minuto a 37°C del sustrato. La ANGPTL4 de ratón inhibió la LPL bovina con un IC₅₀ (concentración requerida para 50% de inhibición) de aproximadamente 25 nM. Ver Figura 14.

J. Generación de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 en ratones carentes (knockout) de Angptl4

[0269] Para generar los anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 de ratón, los ratones carentes (knockout) de Angptl4 fueron cebados y luego reforzados cada dos a tres semanas con ANGPTL4 de ratón purificado producido como se describió anteriormente, Parte VI.H. También se usó Adyuvante de Freund Completo e Incompleto para el cebado y refuerzo, respectivamente. Después de dos a tres refuerzos, los títulos de suero fueron monitoreados mediante ELISA. Una vez se alcanzaron títulos adecuadamente altos, los esplenocitos fueron cosechados de ratones inmunizados y fusionados con células de mieloma (P3/NSI/1-Ag4-1) usando PEG1500 como un agente de fusión. Los productos de fusión celular resultantes fueron diluidos en medio de hibridoma y sembrados en placas de cultivo de tejido de 96 pozos. Después de 1 día, se agregó medio HAT a los cultivos de hibridoma. El medio fue cambiado cada tres o cuatro días según era necesario. Después de diez a catorce días de selección y cultivo, los hibridomas fueron seleccionados mediante ELISA con ANGPTL4 de ratón usado como un antígeno. Nueve anticuerpos monoclonales, designados 14D12, 15F2, 2G12, 10E4, 1A4, 5A6, 14D2, y 6G11, mostraron enlace específico a ANGPTL4 de ratón.

[0270] Los anticuerpos monoclonales también se elevaron contra un péptido que tiene la secuencia de LAPTHLDNGVDKTSRGKR, que corresponde a los residuos de amino ácido 151-168 del ANGPTL4 de ratón de longitud total (SEQ ID NO:1). (El péptido es idéntico a los residuos de amino ácido 151-168 de la SEQ ID NO:1, excepto que el amino ácido C terminal del péptido es arginina, mientras que el amino ácido en la posición 168 de la SEQ ID NO:1 es lisina). El péptido fue conjugado a KLH antes de la inyección. Un anticuerpo monoclonal contra ese péptido fue capaz de enlazarse específicamente al ANGPTL4 de ratón de longitud total. Ese anticuerpo monoclonal fue designado 4A8.

K. Métodos de ELISA

[0271] Los anticuerpos fueron seleccionados para enlace a ANGPTL4 de ratón usando ELISA. Nunc Maxi-Sorp ImmunoPlates™ de noventa y seis pozos (Nunc #446612, Roskilde, Dinamarca) fueron recubiertas mediante la

adición de 50 µl por pozo de una solución de 2.5 µg/ml de ANGPTL4 en amortiguador de recubrimiento (Amortiguador BupH™ Carbonato-Bicarbonato, Pierce #28382, Rockford, IL) durante la noche a 4°C. El amortiguador de recubrimiento fue removido y la placa fue bloqueada mediante la adición de 250 µl por pozo de amortiguador de bloqueo (1% de BSA Blocker™, Pierce #37525, en PBS) por dos horas a temperatura ambiente. Se agregaron 50 µl de sobrenadante de hibridoma (no diluido o diluido en amortiguador de bloqueo) o anticuerpo anti-ANGPTL4 aislado (no diluido o diluido en amortiguador de bloqueo) a los pozos y se incubaron por al menos una hora a temperatura ambiente. Los pozos fueron lavados cuatro veces con PBS/Tween 20. Se agregaron 100 µl IgG anti ratón de cabra conjugado a HRP diluido (1:5,000 a 1:10,000) (Pierce #31446) a los pozos y se incubaron por una hora a 37°C. Los agujeros fueron lavados seis veces con PBS/Tween 20. El anticuerpo anti-ANGPTL4 fue detectado adicionando 50 µl de solución de TMB (tetrametil benzidina) (ImmunoPureKit de sustrato® TMB, Pierce #34021) a los pozos por 5 a 10 minutos. Las placas fueron leídas espectrofotométricamente a 450 nm usando un lector de microplaca (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

L. Actividad neutralizante *in vitro* de anticuerpos monoclonales

[0272] Los anticuerpos monoclonales fueron ensayados para su habilidad para neutralizar la actividad de ANGPTL4 en el ensayo *in vitro* para actividad de LPL discutida anteriormente, Parte VI.I. Se condujeron ensayos de actividad de LPL separados en la presencia de ANGPTL4 de ratón 25 nM y aproximadamente 125 nM de cada uno de los nueve anticuerpos monoclonales anteriores. Los resultados se muestran en la Figura 15. Para cada anticuerpo, la actividad neutralizante es demostrada por la habilidad del anticuerpo para aumentar la actividad de LPL, p.e., para “recuperar”, LPL de la inhibición por ANGPTL4. La actividad de recuperación está indicada en la Figura 15 por el aumento en porcentaje de la actividad de LPL en la presencia de ANGPTL4 y anticuerpo anti-ANGPTL4 con relación a la actividad de LPL en la presencia de ANGPTL4 sola. Cinco de los nueve anticuerpos, 4A8, 14D12, 15F2, 2G12, y 10E4, produjeron un aumento en la actividad de LPL, indicando que aquellos anticuerpos recuperaron la actividad de LPL neutralizando la actividad de ANGPTL4. En particular, los anticuerpos 4A8, 14D12, y 15F2 recuperaron la actividad de LPL en más del 50%. Cuatro de los nueve anticuerpos, 1A4, 5A6,

14D2, y 6G11, parecieron inhibir adicionalmente LPL, indicando que aquellos anticuerpos son capaces de mejorar la actividad de ANGPTL4.

M. Isotipificación

[0273] Los isotipos de 14D12, 15F2, 4A8, y 6G11 fueron determinados mediante métodos estándar. 4A8 y 6G11 son del isotipo IgG1, y 14D12 y 15F2 son del isotipo IgG2a. (Ver las columnas tercera y cuarta de la Tabla 2 siguiente, Parte VI.P.)

N. Mapeo del Epítipo de anticuerpos monoclonales

[0274] Los anticuerpos monoclonales 14D12, 15F2, y 6G11 fueron probados para el enlace al dominio de hélice enrollada N terminal de ANGPTL4 de ratón (desde los amino ácidos 21-174 de la SEQ ID NO: 1) y el dominio del tipo fibrinógeno C terminal de ANGPTL4 de ratón (desde los amino ácidos 174-410 de la SEQ ID NO:1) usando ELISA. 14D12 y 15F2 se enlazaron específicamente al dominio de hélice enrollada N terminal de ANGPTL4 de ratón. 6G11 se enlaza específicamente al dominio del tipo fibrinógeno C terminal de ANGPTL4 de ratón.

O. Familias de Epítipo

[0275] Para determinar si los anticuerpos monoclonales 14D12, 15F2, y 4A8 se enlazan a los mismos epítipos, se realizó la clasificación de familias de epítipo usando tecnología múltiple Luminex® 100 y el analizador Luminex® 100™ (Luminex Corporation, Austin, TX). Ver Jia et al. (2004) J. Immunol. Methods 288:91-98. La clasificación de familia de epítipo utiliza típicamente un ensayo de competencia del tipo emparejado de anticuerpo, en el cual un anticuerpo “sonda” es probado para enlace a un antígeno que es enlazado por un anticuerpo de “referencia”. Si el anticuerpo sonda se enlaza al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia, este no se enlazará eficientemente al antígeno, porque ese epítipo es enmascarado por el anticuerpo de referencia.

[0276] Para realizar la clasificación de familia de epítipo, microesferas carboxiladas xMAP™ marcadas diferencialmente (Luminex, Austin, TX) fueron protegidas de la luz y recubiertas con anticuerpo de captura (IgG de conejo

anti-ratón monoclonal). Las microesferas recubiertas que tienen un marcador dado se dejaron capturar selectivamente por uno de tres anticuerpos de referencia (14D12, 15F2, o 4A8), de forma que cada anticuerpo de referencia fue asociado con un marcador diferente. Las microesferas marcadas diferencialmente fueron combinadas y agregadas a los pozos de una placa de micropozos. Las microesferas fueron dispensadas en los pozos e incubadas durante la noche a 4°C. Se agregó ANGPTL4 de ratón a los pozos y se incubó con agitación a 25°C por 1 hora seguido de lavado. Uno de los tres anticuerpos sonda (14D12, 15F2, or 4A8) fue agregado a cada pozo e incubado a 25°C por 1 hora seguido de lavado. Se agregó anticuerpo de detección biotinilado (IgG de conejo anti-ratón monoclonal) a los pozos para detectar el enlace de ANGPTL4 por el anticuerpo sonda. Se agregó Estreptavidina-PE a los pozos y se incubaron por 30 minutos. Para cada pozo, se usó el analizador Luminex[®] 100™ (una plataforma láser dual, basada en flujo, de clasificación y detección) para detectar el marcador particular asociado con cada microesfera (y así la identidad del anticuerpo de referencia) y la magnitud de la señal derivada de PE asociada con cada microesfera. La magnitud de la señal derivada de PE es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo sonda enlazado al ANGPTL4 de ratón.

[0277] Los resultados se muestran en la Figura 16. Cuando se usó 4A8 como un anticuerpo sonda (primer conjunto de tres barras), se enlazó a ANGPTL4 de ratón cuando se usaron 14D12 y 15F2 como anticuerpos de referencia, según lo indica una fuerte señal de fluorescencia (barras blanca y negra). Así, 4A8 no se enlaza al mismo epítipo que 14D12 y 15F2. Cuando se usó 14D12 como un anticuerpo sonda (Segundo conjunto de tres barras), se enlazó a ANGPTL4 de ratón cuando se usó 4A8 como un anticuerpo de referencia, pero demostró enlace débil cuando se usó 15F2 como un anticuerpo de referencia (comparar barras gris y blanca). Así, 14D12 y 15F2 probablemente se enlazan al mismo epítipo. Igualmente, cuando se usó 15F2 como un anticuerpo sonda (ultimo conjunto de tres barras), este se enlazó a ANGPTL4 de ratón cuando se usó 4A8 como un anticuerpo de referencia, pero demostró enlace débil cuando se usó 14D12 como un anticuerpo de referencia (comparar barras gris y negra), confirmando así que 14D12 y 15F2 probablemente se enlazan al mismo epítipo.

[0278] Se realizó un segundo experimento de clasificación de familia de epítipo using un sistema BIACORE ®3000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sistema BIACORE ®3000 permite el análisis de interacción biomolecular en tiempo real usando tecnología de resonancia de plasmón superficial. Esencialmente, la habilidad de un complejo antígeno-anticuerpo para inhibir el enlace de anticuerpo libre se usa para determinar el enlace a epítipo común en un proceso de inhibición competitivo.

[0279] El experimento se realizó usando los anticuerpos 14D12, 15F2, 90B4, 16B10, 4A8, y 9C10. Los anticuerpos fueron directamente inmovilizados en el chip BIACORE o enlazados al chip mediante captura con chip enlazado a Fc IgG anti-ratón. Con el fin de determinar la familia de epítipo para cada anticuerpo, el anticuerpo enlazado fue incubado con N-mANGPTL4 y cualquiera del mismo anticuerpo en solución o un anticuerpo diferente en solución. Se dejó entonces que el sistema alcanzara el equilibrio. Con base en la inhibición de enlace recíproca, las siguientes familias de epítipo fueron asignadas: Familia I contenía 14D12 y 15F2, Familia II contenía 90B4 y 16B10, Familia III contenía solamente 4A8 y Familia IV contenía 9C10. Aquellos resultados son consistentes con el primer experimento de clasificación de familia de epítipo, discutido anteriormente.

P. La administración *in vivo* de anticuerpos monoclonales con actividad neutralizante recapituló el fenotipo carente (knockout)

[0280] Los anticuerpos con actividad neutralizante *in vitro* fueron administrados a ratones para determinar si tales anticuerpos podrían recapitular el fenotipo de ratones carentes (knockout) de Angptl4. Para administrar los anticuerpos *in vivo*, los ratones alimentados con una dieta estándar (ratones "alimentados con chow") o ratones con DIO inducida por HFD fueron inyectados con 30 µg de un anticuerpo monoclonal en un volumen de 10 µl por gramo de peso corporal, como se indica más adelante en la Tabla 2. El anticuerpo anti-KLH fue administrado como un anticuerpo de control. Los niveles en suero en ayuno de triglicérido, colesterol, y FFA se midieron después de cuatro días.

Tabla 2.

Grupos ratones /grupo)	(n=8	Dieta	MAb (30mg/kg)	Isotipo
1		Alimentado con Chow	Anti-KLH	IgG1
2		Alimentado con Chow	Anti-KLH	IgG2a
3		Alimentado con Chow	4A8	IgG1
4		Alimentado con Chow	14D12	IgG2a
5		Alimentado con Chow	15F2	IgG2a
6		Alimentado con Chow	6G11	IgG1
7		HFD	Anti-KLH	IgG1
8		HFD	Anti-KLH	IgG2a
9		HFD	4A8	IgG1
10		HFD	14D12	IgG2a
11		HFD	15F2	IgG2a
12		HFD	6G11	IgG1

[0281] Los resultados se muestran en las Figuras 17-19. En ratones alimentados con una dieta estándar, una sola administración de 14D12 redujo significativamente los niveles en suero en ayuno de triglicérido en 72.7% y 67.0% (en dos estudios independientes), los niveles de colesterol total en ayuno en 27.1% y 21.3% (en dos estudios independientes), y niveles de FFA en ayuno en 44.3% (en un solo estudio). Igualmente, una sola administración de 15F2 redujo los niveles en suero en ayuno de triglicérido en 67.6% y 71.8% (en dos estudios independientes), los niveles de colesterol total en ayuno en

22.8% y 28.0% (en dos estudios independientes), y niveles de FFA en ayuno en 39.3% (en un solo estudio). Aquellas observaciones son consistentes que la habilidad de 14D12 y 15F2 para recuperar la actividad de LPL *in vitro*. Sin embargo, una sola administración de 4A8 no tuvo efecto significativo en los niveles en suero en ayuno de triglicérido, colesterol, y FFA (ver gráficas de barras, Figuras 17-19), a pesar que el anticuerpo era capaz de recuperar la actividad de LPL *in vitro*. En contraste, una sola administración de 6G11 elevó los niveles en suero en ayuno de triglicérido en 66.4%, lo cual es consistente con la habilidad de ese anticuerpo para inhibir adicionalmente la actividad de LPL *in vitro*. La administración de 6G11 no tuvo efecto significativo en los niveles en ayuno de colesterol total y FFA (ver gráficas de barras, Figuras 18-19).

[0282] Los resultados obtenidos usando ratones con DIO inducida por HFD se muestran en las Figuras 20-21. Una sola administración de 14D12 redujo los niveles en suero en ayuno de triglicérido en 53.2% y los niveles en ayuno de colesterol total en 27.6%. Igualmente, 15F2 redujo los niveles en suero en ayuno de triglicérido en 56.6% y niveles de colesterol en 31.0%. 4A8 no tuvo efecto significativo en los niveles en suero de triglicérido o colesterol total (ver gráficas de barras, Figuras 20-21). Una sola administración de 6G11 elevó significativamente los niveles en suero en ayuno de triglicérido en 60.9% pero no tuvo efecto significativo en los niveles de colesterol total en ayuno (ver gráfica de barras, Figura 21). Los niveles de FFA no se midieron en ratones DIO.

[0283] Los resultados anteriores mostraron que la administración de ciertos anticuerpos que neutralizan la actividad de ANGPTL4 recapitularon los niveles de lípido en suero disminuidos vistos en los ratones carentes de (knockout) Angptl4. Con base en estos resultados, se espera que la administración de tales anticuerpos recapitularía otros aspectos del fenotipo carente de (knockout) Angptl4, por ejemplo, actividad de LPL endógena aumentada en el estado de ayuno, protección aumentada de la esteatosis hepática y acumulación de lípido intramiocelular, y protección aumentada de la tolerancia a la glucosa.

[0284] Los anticuerpos neutralizantes también fueron administrados en el curso de cinco semanas para evaluar los efectos de la administración

continua. Los ratones con DIO inducida por HFD fueron inyectados una vez a la semana con 14D12, 15F2, o un anticuerpo de control de isotipo coincidente (antiKLH) por cinco semanas. La dosis fue de 30 µg de anticuerpo monoclonal en un volumen de 10 µl por gramo de peso corporal. Los niveles en suero de lípido en ayuno se midieron y compararon con los niveles en suero de lípido en ayuno de ratones que reciben solamente una sola administración de anticuerpo. Como se muestra en las Figuras 22-23, una sola administración de 14D12 disminuyó los triglicéridos en suero en ayuno en 53.22% y colesterol en 27.58%, mientras que la administración semanal de 14D12 en el curso de cinco semanas disminuyó los triglicéridos en suero en ayuno en 59.36% y colesterol en 44.21%. Igualmente, una sola administración de 15F2 disminuyó los triglicéridos en suero en ayuno en 56.61% y colesterol en 30.97%, mientras que la administración semanal de 15F2 en el curso de cinco semanas disminuyó los triglicéridos en suero en ayuno en 64.45% y colesterol en 32.73%. En este estudio, la administración semanal de 14D12 o 15F2 en las cinco semanas no tuvo un efecto significativo en FFA, la tolerancia a la glucosa, o peso corporal, comparado con una sola administración. (Datos no mostrados). Estos resultados mostraron que la administración continua de anticuerpos que neutralizan la actividad de ANGPTL4 mantuvieron o disminuyeron adicionalmente los niveles en suero en ayuno de triglicérido y colesterol total con relación a una sola administración.

[0285] Los niveles en suero en ayuno de cuerpos cetónicos (KB) también se midieron en ratones DIO inyectados semanalmente con 14D12, 15F2, o un anticuerpo de control (antiKLH) por cinco semanas como se describió anteriormente. Los ratones DIO inyectados con 14D12 o 15F2 tenían niveles significativamente mayores de cuerpos cetónicos que los ratones DIO inyectados con anticuerpo de control. Ver Figura 24. Se conoce que los cuerpos cetónicos son producidos cuando el cuerpo rompe los lípidos. Así, niveles aumentados de cuerpos cetónicos puede ser un posible mecanismo mediante el cual los niveles de lípido hepático e intramiocelular son reducidos en ratones inyectados con anticuerpo neutralizante.

Q. Generación de ratones carentes de (knockout) Angptl4 de anticuerpos monoclonales que reaccionan cruzadamente con ANGPTL4 humana y de ratón

[0286] Los anticuerpos monoclonales que reaccionan cruzadamente con ANGPTL4 humana y de ratón fueron propagados en ratones carentes (knockout) de Angptl4 usando N-mANGPTL4, que contiene una porción del dominio amino terminal de ANGPTL4 de ratón.

[0287] Una secuencia de polinucleótido que codifica los amino ácidos 23 a 180 de ANGPTL4 de ratón fue clonada en un vector de expresión pET22b(+) (Novagen). Ese vector codifica una secuencia líder pelB N terminal, así como una etiqueta His C terminal. El vector de expresión resultante es llamado pET-N-mANGPTL4. Siguiendo la traducción de la proteína y la remoción de todos excepto 11 amino ácidos de la secuencia pelB, N-mANGPTL4 tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 10. Esta secuencia contiene 11 amino ácidos de la secuencia de pelB, seguida por los amino ácidos 23 a 180 del ANGPTL4 de ratón (subrayado en la Tabla 6), seguido por un enlazante de 2 amino ácidos y la etiqueta His.

[0288] El N-mANGPTL4 es expresado y purificado de E. coli de la siguiente forma. Diez ml de LB que contienen 50 µg/ml de cloramfenicol y 100 µg/ml de carbenicilina son incubados con una colonia de E. coli transformada con pET-N-mANGPTL4. El cultivo es incubado a 37°C durante la noche. El cultivo de 10 ml es entonces transfectado a 500 ml de LB sin antibióticos e incubado a 37°C hasta que el OD₆₀₀ alcanza 0.6 (aproximadamente 2 horas). Se agrega IPTG hasta una concentración final de 1 mM y el cultivo es incubado con agitación a 200 rpm a 30°C por 4 horas. El cultivo es entonces colocado en hielo por 5 minutos. Las células son precipitadas mediante centrifugación a 8000 rpm en un rotor JLA16.25 por 15 minutos. El sedimento es entonces resuspendido en 50 ml de amortiguador de lisis (Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.5 M, 1% de Triton X-100, 1x de coctel de inhibidor de proteasa (Roche) y 0.25 ml de PMSF (0.1 M en isopropanol)). Las células lisadas son entonces centrifugadas a 9700 rpm en un rotor JA25.5 por 30 minutos. El sobrenadante es removido y clarificado adicionalmente mediante centrifugación a 28,000 rpm en un rotor SW28 por 30 minutos. El N-mANGPTL4 recombinante puede

entonces ser purificado del sobrenadante clarificado usando cromatografía Probond (Ni) (Invitrogen).

[0289] Para purificar N-mANGPTL4 recombinante del sedimento insoluble remanente después de la centrifugación de las células lisadas, el sedimento es lavado con 30 ml de amortiguador de lisis y centrifugado a 9700 rpm en un rotor JA25.5. El paso de lavado es repetido dos veces, para un total de tres lavados. La proteína insoluble del sedimento es entonces disuelta en 10 ml de amortiguador desnaturalizante (Tris 50 mM, pH 8.0, Guanadina HCl 6 M). La solución es entonces centrifugada a 28,000 rpm en un rotor JA25.5 por 30 minutos. El sobrenadante es entonces cargado en una columna de resina Probond de 5 ml. La columna es lavada con 50 ml de amortiguador de lavado (Tris 50 mM, pH 8.0, NaCl 1 M, urea 8 M, imidazol 15 mM). La proteína recombinante es replegada en la columna con un gradiente de 50 ml que va desde el amortiguador de lavado al amortiguador desnaturalizante (Tris 50 mM, pH 8.0, NaCl 1 M, 0.5% de Tween 20). La proteína recombinante es entonces eluida con amortiguador de elusión (amortiguador de re-naturalizante con imidazol 250 mM). Las fracciones que contienen la proteína recombinante son recolectadas y dializadas contra amortiguador de almacenamiento (Tris 50 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM, 0.2% de Tween 20). El N-mANGPTL4 purificado es alicuotado y almacenado a -70°C.

[0290] Los ratones fueron cebados con 40 µg de N-mANGPTL4 en Adyuvante de Freund completo intraperitonealmente. Los ratones fueron reforzados después de dos semanas con 30 µg de N-mANGPTL4 en Adyuvante de Freund Incompleto (IFA) intraperitonealmente, y luego reforzados de nuevo después de otras dos semanas con 20 µg de N-mANGPTL4 en IFA intraperitonealmente. Alternativamente, se pueden usar adyuvantes basados en quitosan. Ver, p.e., Patentes U.S. Nos. 5,912,000; 5,965,144; y 5,980,912. One semana después del segundo refuerzo, se midieron los títulos en suero mediante ELISA, como se describió anteriormente en el Ejemplo K, excepto que los pozos fueron recubiertos con 50 µl de 0.25 µg/ml mANGPTL4. Dos semanas después del segundo refuerzo, los ratones fueron reforzados con 10 µg de ANGPTL4 de ratón purificado producido como se describió anteriormente, Parte VI.H., en IFA intraperitonealmente. Una semana después del tercer refuerzo, los títulos en suero fueron medidos de nuevo mediante ELISA como se describió anteriormente en este párrafo. Aproximadamente

dos y media semanas después del tercer refuerzo, los ratones fueron reforzados con 10 µg de N-mANGPTL4 intravenosamente.

[0291] Los esplenocitos fueron cosechados tres días después de ratones inmunizados y fusionados con células de mieloma (NSI) usando PEG1500 como un agente de fusión. Los productos de fusion celular resultantes fueron diluidos en medio de hibridoma y sembrados en placas de cultivo de tejido de 96 pozos. Después de 1 día, se agregó medio HAT a los cultivos de hibridoma. El medio fue cambiado cada tres o cuatro días según fuera necesario.

[0292] Después de diez a catorce de selección y cultivo, los hibridomas fueron seleccionados mediante ELISA para identificar aquellos que expresan el anticuerpo que reacciona cruzadamente con ANGPTL4 humano y de ratón. Las ELISAs se realizaron como se discutió anteriormente en el Ejemplo K, excepto que las placas fueron recubiertas con 50 µl de una solución de 0.25 µg/ml de proteína y cada anticuerpo fue probado separadamente contra ANGPTL4 de ratón y ANGPTL4 humana. La ANGPTL4 de ratón y ANGPTL4 humana fueron purificadas del medio acondicionado de células CHO infectadas con Ad5-mAngptl4T y Ad5-mAngptl4T, respectivamente, como se discutió anteriormente en el Ejemplo H. Se seleccionaron quince anticuerpos monoclonales que reaccionan cruzadamente con ANGPTL4 de ratón y humana. Se determinaron los isotipos de los anticuerpos seleccionados, y se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.

Designación de Anticuerpo	Isotipo
3H1	IgG1
5A8	IgG1
8D8	IgG1
9C10	IgG1
19C9	IgG1
20C9	IgG1
18A2	IgG2a

5F2	IgG2b
7H8	IgG2b
11C11	IgG2b
16A11	IgG2b
18G3	IgG2b
90B4	IgG2b

R. Actividad *in vivo* de los anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4

[0293] Los anticuerpos 14D12, 19C9, 18G3, 18A2, 9C10, y 90B4, así como anti-KLH como un control, fueron probados para ciertas actividades *in vivo* en ratones, de la siguiente manera. Se inyectaron treinta mg/kg de peso corporal de anticuerpo en un ratón albino tipo nativo C57 intraperitonealmente. Cada anticuerpo fue probado en cinco ratones. Después de cuatro días, se midieron los niveles en suero en ayuno de triglicérido y colesterol total. Los niveles en suero en ayuno de triglicérido de los ratones inyectados en anticuerpo en ese experimento se muestran en la Figura 31. Los anticuerpos 14D12 y 90B4 redujeron los triglicéridos en suero en ayuno hasta un grado estadísticamente significativo, en 73.6% y 54.9%, respectivamente. Los niveles de colesterol total en ayuno de ratones inyectados con anticuerpo en ese experimento se muestran en la Figura 32. Los anticuerpos 14D12 y 90B4 redujeron el colesterol total en ayuno a un grado estadísticamente significativo, en 25.2% y 22.2%, respectivamente.

S. Afinidad de enlace relativa de los anticuerpos monoclonal contra ANGPTL4

[0294] La afinidad de enlace de los anticuerpos 90B4, 15F2, y 14D12 se determinó para cada uno de N-mANGPTL4 y N-hANGPTL4 mediante ELISA. El N-hANGPTL4 se expresó y purificó a partir de bacterias como se describió anteriormente para N-mANGPTL4 en el Ejemplo Q. Una secuencia de polinucleótido que codifica los amino ácidos 24 a 175 de ANGPTL4 humana fue clonado en el vector de expresión pET22b(+), que codifica una secuencia pelB líder N terminal y una etiqueta His C terminal. Siguiendo la traducción de la

110

proteína y la remoción de todos excepto 11 amino ácidos de la secuencia pelB, N-hANGPTL4 tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 11. Esa secuencia contiene 11 amino ácidos de la secuencia pelB, seguida por los amino ácidos 24 a 175 de ANGPTL4 humana (subrayada en la Tabla 6), seguida por un enlazante de 2 amino ácidos y la etiqueta His. Las ELISAs se realizaron como se discutió anteriormente en el Ejemplo K, excepto que las placas fueron recubiertas con 50 µl de 0.25 µg/ml de proteína (N-mANGPTL4 o N-hANGPTL4) por pozo. El enlace se midió a 0 µg/ml, 0.08 µg/ml, 0.4 µg/ml, 2 µg/ml, y 10 µg/ml de anticuerpo. Los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 33. 90B4 tuvo mayor afinidad para N-mANGPTL4 (panel A) y N-hANGPTL4 (panel B) que cualquiera de 15F2 o 14D12. 15F2 tuvo mayor afinidad para N-mANGPTL4 que 14D12, pero afinidad comparable con 14D12 para N-hANGPTL4.

T. Respuesta a la dosis de 14D12 para disminuir los triglicéridos en suero

[0295] Cinco ratones tipo nativo albinos C57 alimentados con HFD fueron inyectados subcutáneamente con las concentraciones específicas discutidas más adelante de anticuerpo 14D12 o anticuerpo anti-KLH. Después de 4 días y 7 días, se determinó la reducción porcentual de triglicéridos totales con respecto al tiempo 0. Las concentraciones de anticuerpo probadas en ese experimento fueron 0.3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 10 mg/kg de peso corporal, 30 mg/kg de peso corporal, y 90 mg/kg de peso corporal. Los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 34. Después de 4 días, la administración de 10 mg/kg de peso corporal, 30 mg/kg de peso corporal, y 90 mg/kg de peso corporal produjeron una reducción estadísticamente significativa de triglicéridos en suero. Ver Figura 34, panel A. Ese efecto continuo y permaneció estadísticamente significativo después de 7 días. Ver Figura 34, panel B.

U. Farmacodinámica y farmacocinética de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4

[0296] Para determinar la farmacodinámica de 14D12, ratones albinos C57 fueron inyectados con 30 µg/g de peso corporal de 14D12 y se midieron sus niveles en suero en ayuno de triglicérido y colesterol total después de

ciertos intervalos de tiempo indicados en la Tabla 4, siguiente. Los ratones fueron alimentados con una dieta regular (“chow”). Se usaron un total de ocho grupos de tres ratones en el experimento. Un grupo de tres ratones no fue inyectado con el anticuerpo y se usó como línea basal. Los siete grupos restantes de ratones recibieron inyecciones de 14D12. Los ratones fueron inyectados, en condición de ayuno, y sangrados de acuerdo con el siguiente programa:

Tabla 4

Grupo	Día inyectado	Día en ayuno	Día de sangrado	Punto de tiempo (día)
1	3	3	4	1
2	2	3	4	2
3	1	3	4	3
4	4	7	8	4
5	3	7	8	5
6	2	7	8	6
7	1	7	8	7

[0297] Para determinar la farmacocinética de 14D12, cuatro ratones albinos C57 fueron inyectados con 30 mg/kg de peso corporal de 14D12 a las 8 a.m. en el día 1. Cuatro ratones albinos C57 adicionales fueron inyectados con 30 mg/kg de anti-KLH a las 8 a.m. en el día 1 como un control. Cada ratón fue entonces sangrado después de 1 hora, 5 horas, 10 horas, 1 día, 2 días, 4 días, 7 días, 10 días, y 14 días, y la concentración de anticuerpo en la sangre se determinó de la siguiente forma. Se realizó una ELISA como se discutió anteriormente en el Ejemplo K, excepto que cada pozo fue recubierto con 50 µl de 0.5 µg/ml de N-mANGPTL4. Se probaron las siguientes diluciones de suero de ratón mediante ELISA: 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶. Estándares que contienen 0.08 µg/ml, 0.4 µg/ml, 2 µg/ml, y 10 µg/ml de 14D12 se probaron en paralelo con las diluciones de suero de ratón.

[0298] Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 35. El Panel A muestra una gráfica de concentración de 14D12 y niveles en suero en ayuno de triglicérido en el tiempo. La concentración alcanza su pico de 14D12 a aproximadamente 24 horas después de la inyección, mientras que la concentración en suero en ayuno de triglicérido alcanza un mínimo

A12

aproximadamente 96 horas después de la inyección, y permanece disminuida hasta al menos 336 horas después de la inyección, cuando el experimento terminó. El Panel B muestra una gráfica de concentración de 14D12 y niveles en ayuno de colesterol total en el tiempo. Como se declaró anteriormente, la concentración de 14D12 alcanza su pico a aproximadamente 24 horas después de la inyección. El colesterol total en ayuno alcanza un mínimo de aproximadamente 168 horas después de la inyección, y permanece disminuido hasta al menos 336 horas después de la inyección, cuando el experimento terminó.

V. Administración de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 en ratones que sobreexpresan ANGPTL4 humana

[0299] Para determinar si ciertos anticuerpos monoclonales pueden reducir los triglicéridos y el colesterol total en suero en ayuno en ratones que sobreexpresan ANGPTL4 humana, Ad5-hAngptl4T (descrito en el Ejemplo B.2., anterior) fue inyectado a 1×10^9 IU/ratón en las venas de la cola de ratones albinos C57. Un total de cuatro grupos de cinco ratones fueron inyectados con Ad5-hAngptl4T. Cada uno de los cuatro grupos también fue inyectado con 30 mg/kg de un anticuerpo al mismo tiempo como una infección por virus. Los anticuerpos inyectados fueron anti-KLH, 14D12, 15F2, y 90B4. Después de cuatro días, se midieron los niveles en suero en ayuno de triglicérido y colesterol total en los ratones.

[0300] La Figura 36 muestra los niveles en suero en estado alimentado de triglicérido en los ratones en ese experimento. Cada uno de los cinco ratones en cada grupo está representado por un símbolo diferente en la Figura 36. Los ratones inyectados con anti-KLH tenían niveles en suero de triglicérido de entre aproximadamente 750 mg/dl de aproximadamente 1900 mg/dl. Tres de los ratones inyectados con 14D12 tenía niveles en suero de triglicérido por debajo a los de los ratones inyectados con anti-KLH. Los ratones restantes inyectados con 14D12 tenían niveles de triglicérido elevados con relación a ratones inyectados con anti-KLH. Tres de los ratones inyectados con 15F2 tenían niveles en suero de triglicérido muy por debajo de los de los ratones inyectados con anti-KLH, mientras que los dos ratones restantes inyectados con 15F2 tenían niveles en suero de triglicérido que eran similares a los ratones inyectados con anti-KLH. Finalmente, tres de los ratones inyectados

con 90B4 tenían niveles en suero de triglicérido por debajo de los de los ratones inyectados con anti-KLH, mientras que dos de los ratones inyectados con 90B4 tenían niveles en suero de triglicérido elevados con relación a ratones inyectados con anti-KLH.

[0301] Los resultados muestran que aproximadamente la mitad de los ratones inyectados con anticuerpos contra ANGPTL4 tenían niveles en suero de triglicérido con relación a los ratones inyectados con el anticuerpo anti-KLH. Algunos ratones inyectados con anticuerpos contra ANGPTL4 tenían niveles en suero de triglicérido elevados, que puede deberse a la variación de la infección por Ad-hANGPTL4T y posible expresión en el hígado.

[0302] La Figura 37 muestra los niveles de colesterol total en ayuno en los ratones en ese experimento. Cada uno de los cinco ratones en cada grupo están representados por el mismo símbolo que en la Figura 36. Todos los cinco ratones inyectados con anti-KLH tenían niveles de colesterol total de entre aproximadamente 180 mg/dl y aproximadamente 240 mg/dl. Tres de los ratones inyectados con 14D12 tenían niveles de colesterol total por debajo de los de los ratones inyectados con anti-KLH. Los dos ratones restantes inyectados con 14D12 tenían niveles de colesterol total por encima de los ratones inyectados con anti-KLH. Cuatro de los ratones inyectados con 15F2 tenían niveles de colesterol total por debajo de los de ratones inyectados con anti-KLH, mientras que un ratón inyectado con 15F2 tenía un nivel de colesterol total comparable a los ratones inyectados con anti-KLH. Finalmente, dos de los ratones inyectados con 90B4 tenían niveles de colesterol total menores de los de ratones inyectados con anti-KLH, mientras que uno de los ratones inyectados con 90B4 tenía un nivel de colesterol comparable con los ratones inyectados con anti-KLH, y uno de los ratones inyectado con 90B4 tenía un nivel de colesterol total mayor que los ratones inyectados con anti-KLH.

[0303] En general, aproximadamente la mitad de los ratones infectados con Ad5-hANGPTL4T e inyectados con anticuerpos contra ANGPTL4 tenían niveles de colesterol total menores que ratones infectados con Ad5-hANGPTL4T e inyectados con anti-KLH. De nuevo, los ratones infectados con Ad5-hANGPTL4T e inyectados con anticuerpos contra ANGPTL4 que tenían niveles de colesterol elevados pueden ser el resultado de la variación de la infección por Ad5-ANGPTL4T y posible expresión en el hígado.

[0304] Estos resultados demuestran que la inyección con los anticuerpos 14D12, 15F2, y 90B4 pueden reducir los triglicéridos y colesterol total en suero en ratones que sobre expresan ANGPTL4 humana.

W. Administración de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 en ratones carentes (knockout) de LDLr

[0305] Se ha encontrado que los ratones carentes (knockout) de LDLr tienen niveles en suero elevados de colesterol, especialmente cuando son alimentados con una dieta alta en grasa. Ver, p.e., Ishibashi et al. (1993) *J. Clin. Invest.* 92 :883-93. Para determinar si ciertos anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 podrían reducir los niveles en suero de colesterol y triglicérido en ratones carentes (knockout) de LDLr, se realizó el siguiente experimento. Tres grupos de quince ratones carentes de LDLr (knockout) de 12 a 13 semanas de edad (Jackson Laboratories, cepa B6.129S7-*Ldlr*^{tm1Hei}/J) fueron inyectados con solo vehículo, 30 mg/kg de anti-KLH, o 30 mg/kg de 14D12 intraperitonealmente. Cada ratón recibió una inyección por semana por quince semanas. Un cuarto grupo de quince ratones se dejó sin tratamiento. Todos los ratones fueron alimentados con una dieta Clinton (Research Diets, producto no. D12107 empezando el día de la primera inyección.

[0306] Se determinaron los niveles en suero en ayuno de triglicérido en cada ratón al final de las 15 semanas. Ver Figura 38. Los niveles en suero de triglicérido en ratones inyectados con 14D12 fueron significativamente menores que los niveles en suero de triglicérido en ratones inyectados con anti-KLH, vehículo, o ratones que no fueron tratados.

[0307] Los niveles de colesterol total en ayuno se determinaron en cada ratón al final de las 15 semanas. Ver Figura 39. Los niveles de colesterol total en ratones inyectados con 14D12 fueron significativamente menores que los niveles de colesterol total en ratones inyectados con anti-KLH, vehículo, o ratones que no fueron tratados.

[0308] En ese experimento, los ratones carentes (knockout) de LDLr inyectados con 14D12 cada semana por 14 semanas no mostraron diferencia en la tolerancia a la glucosa o niveles de insulina con relación a los ratones

carentes de (knockout) LDLr inyectados con anti-KLH o vehículo cada semana por 14 semanas. Adicionalmente, en ese experimento, no hubo diferencia en el contenido de grasa corporal, porcentaje de grasa corporal, o masa corporal magra entre ratones inyectados con 14D12 cada semana por 8 semanas y ratones inyectados con anti-KLH o vehículo cada semana por 8 semanas. Finalmente, el porcentaje de placa en el árbol aórtico de ratones inyectados con 14D12 cada semana por 15 semanas no fue estadísticamente significativamente diferente del porcentaje de placa en el árbol aórtico de ratones inyectados con anti-KLH o vehículo cada semana por 15 semanas en ese experimento. (Datos no mostrados).

[0309] Estos resultados mostraron que 14D12 puede disminuir los niveles en suero de triglicérido y colesterol total en ratones carentes (knockout) de LDLr. En ese experimento, el anticuerpo monoclonal 14D12, sin embargo, no causó tolerancia a la glucosa o cambios de los niveles de insulina en aquellos ratones. En ese experimento, el anticuerpo monoclonal 14D12 no alteró la composición corporal en esos ratones o redujo el porcentaje de placa en el árbol aórtico. En adición, al final del experimento, uno de trece ratones carentes (knockout) de LDLr que recibió 15 inyecciones semanales de 14D12 tenía el abdomen distendido, mientras que dos de trece ratones carentes (knockout) de LDLr que recibieron 15 inyecciones semanales de 14D12 tenían lesiones típicas en los ganglios linfáticos mesentéricos y linfáticos. Finalmente, las citoquinas inflamatorias en suero no fueron elevadas en ratones carentes (knockout) de LDLr quienes recibieron 15 inyecciones semanales de 14D12 con relación a ratones que recibieron anti-KLH o vehículo. (Datos no mostrados).

[0310] Luego, se determine el efecto de una sola inyección de 14D12 en ratones carentes (knockout) de LDLr. Cada ratón recibió una sola inyección intraperitoneal de 30 mg/kg de peso corporal de anti-KLH o 14D12. Seis ratones fueron inyectados con 14D12 y cinco ratones fueron inyectados con anti-KLH. Después de cuatro días, se determinaron los niveles en suero de triglicérido y colesterol total en los ratones.

[0311] Los niveles en suero en ayuno de triglicérido se muestran en la Figura 42. Una sola inyección de 14D12 produjo una reducción de 68.8% en triglicéridos en suero después de 4 días. Ese resultado fue estadísticamente

significativo. Los niveles de colesterol total en ayuno se muestran en la Figura 43. 14D12 no redujo los niveles de colesterol a un grado estadísticamente significativo en ese experimento.

[0312] Esos resultados demostraron que una sola inyección del anticuerpo monoclonal contra ANGPTL4 probado en ese experimento produjo una reducción significativa de triglicéridos en suero en ratones carentes (knockout) de LDLr.

X. Administración de anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 en ratones carentes (knockout) de ApoE

[0313] Se ha encontrado que los ratones carentes (knockout) de ApoE desarrollan hipercolesterolemia espontánea. Ver, p.e., Piedrahita et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(10):4471-5; y Zhang et al. (1992) *Science* 258(5081):468-71. Para determinar si ciertos anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 pueden reducir los niveles en suero de colesterol y triglicérido en ratones carentes (knockout) de ApoE, se realizó el siguiente experimento. Tres grupos de quince ratones carentes (knockout) de ApoE de 14 semanas de edad (Taconic Amino Models, cepa B6.129P2-Apoe^{tm1Unc} N11) fueron inyectados con vehículo solo, 30 mg/kg de anti-KLH, o 30 mg/kg de 14D12 intraperitonealmente. Cada ratón recibió una inyección por semana durante quince semanas. Un cuarto grupo de quince ratones se dejó sin tratar. Todos los ratones fueron alimentados con una dieta Western (Research Diets, producto no. D12079B) iniciando en el día de la primera inyección.

[0314] Se determinaron los niveles en suero en ayuno de triglicérido en cada ratón al final de las 15 semanas. Ver Figura 40. Los niveles en suero de triglicérido en ratones inyectados con 14D12 fueron significativamente menores que los niveles en suero de triglicérido en ratones inyectados con anti-KLH o ratones que no fueron tratados. Sin embargo, los niveles en suero de triglicérido en ratones inyectados con 14D12 no fueron significativamente menores que los niveles en suero de triglicérido en ratones tratados solamente con vehículo en ese experimento.

[0315] Los niveles de colesterol total en ayuno se determinaron en cada ratón al final de las 15 semanas. Ver Figura 41. Los niveles de colesterol total

en ratones inyectados con 14D12 no fueron significativamente menores que los niveles de colesterol total en ratones inyectados con anti-KLH o vehículo en ese experimento, pero fueron significativamente menores que los niveles de colesterol total en ratones que se dejaron sin tratar.

[0316] En ese experimento, no hubo diferencia en el contenido de grasa corporal, porcentaje de grasa corporal, o masa corporal magra entre ratones inyectados con 14D12 cada semana durante 15 semanas y ratones inyectados con anti-KLH o vehículo cada semana durante 15 semanas. Adicionalmente, el porcentaje de placa en el árbol aórtico de ratones inyectados con 14D12 cada semana durante 15 semanas no fue estadísticamente significativamente diferente del porcentaje de placa en el árbol aórtico de ratones inyectados con anti-KLH o vehículo cada semana durante 15 semanas en ese experimento. (Datos no mostrados).

[0317] Esos resultados mostraron que 14D12 puede disminuir los niveles en suero de triglicérido en ratones carentes (knockout) de ApoE. En ese experimento, sin embargo, el anticuerpo monoclonal 14D12 no redujo los niveles de colesterol total en ratones carentes (knockout) de ApoE. En ese experimento, el anticuerpo monoclonal 14D12 tampoco alteró la composición corporal en esos ratones o redujo el porcentaje de placa en el árbol aórtico. En adición, al final del experimento, tres de quince ratones carentes (knockout) de ApoE que recibieron 15 inyecciones semanales de 14D12 tenían un abdomen distendido, mientras que trece de quince de los ratones carentes (knockout) de ApoE que recibieron 15 inyecciones semanales de 14D12 tenían lesiones típicas en los ganglios linfáticos mesentéricos o linfáticos. Finalmente, seis de quince de los ratones carentes (knockout) de ApoE que recibieron 15 inyecciones semanales de 14D12 tenían ascitis quillosa. Las citoquinas inflamatorias en suero no fueron elevadas en ratones carentes (knockout) de ApoE quienes recibieron 15 inyecciones semanales de 14D12 con relación a ratones que recibieron anti-KLH o vehículo. (Datos no mostrados).

[0318] Luego se determinó el efecto de una sola inyección de 14D12 en ratones carentes (knockout) de ApoE. Cada ratón recibió una sola inyección intraperitoneal de 30 mg/kg de peso corporal de anti-KLH o 14D12. Seis ratones fueron inyectados con 14D12 y siete ratones fueron inyectados con

anti-KLH. Después de cuatro días, se determinaron los niveles en suero en ayuno de triglicérido y colesterol total en los ratones.

[0319] Los niveles en suero en ayuno de triglicérido se muestran en la Figura 44. Una sola inyección de 14D12 produjo una reducción de 55.4% en los triglicéridos en suero después de 4 días. Ese resultado fue estadísticamente significativo. Los niveles en ayuno de colesterol total se muestran en la Figura 45. Una sola inyección de 14D12 produjo una reducción de 39.5% de triglicéridos en suero después de 4 días. Ese resultado también fue estadísticamente significativo.

[0320] Esos resultados demostraron que una sola inyección de anticuerpo monoclonal 14D12 puede producir una reducción significativa de los niveles en suero de triglicéridos y colesterol total en ratones carentes (knockout) de ApoE.

Y. Administración de un anticuerpo monoclonal contra ANGPTL4 a ratones db/db

[0321] Se ha encontrado que los ratones Db/db muestran obesidad y fenotipos diabéticos. Ver, p.e., Chen et al. (1996) *Cell* 84 :491-495; y Chua Jr et al. (1996) *Science* 271 :994-996. Para determinar el efecto de ciertos anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4 en la obesidad y parámetros de diabetes, se realizó el siguiente experimento.

[0322] Cada ratón en un primer grupo de diez ratones db/db fue inyectado con 30 mg/kg de peso corporal de anti-KLH subcutáneamente. Cada ratón en un segundo grupo de diez ratones db/db fue inyectado con 30 mg/kg de peso corporal de 14D12 subcutáneamente. Se midieron los niveles en suero en ayuno de triglicérido antes de la inyección, y luego se midieron una semana después de la inyección. Los ratones recibieron entonces inyecciones semanales, y los niveles en suero en ayuno de triglicérido se midieron después de 8 inyecciones semanales. Los ratones fueron alimentados con una dieta chow.

[0323] Los resultados se muestran en la Figura 46. El Panel A muestra los niveles en suero en ayuno de triglicérido una semana después de una sola

inyección con anti-KLH o 14D12. En ese experimento, la inyección de 14D12 redujo los triglicéridos en suero a un grado estadísticamente significativo. El Panel B muestra los triglicéridos en suero en ayuno de ratones después de 8 inyecciones semanales con 14D12 o anti-KLH. En ese experimento, 14D12 redujo los triglicéridos en suero en 56%, lo cual fue estadísticamente significativo.

[0324] Los niveles en suero de glucosa e insulina no cambiaron por la inyección de 14D12 en ese experimento. Los pesos corporales de los ratones tampoco cambiaron por la inyección de 14D12 en ese experimento.

Z. Secuenciamiento de ciertos anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4

[0325] Las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de 14D12, 15F2, y 90B4 fueron clonadas y secuenciadas usando una versión modificada del método descrito en Gilliland et al (1996) *Tissue Antigens* 47: 1-20. El método fue modificado para usar cebadores de RACE y PCR adecuados para el patrón genético de ratón. Una alineación de las regiones variables de cadena pesada, incluyendo una secuencia de consenso (SEQ ID NO: 15), se muestra en la Figura 47. En adición, la homología porcentual de las regiones variables de cadena pesada entre cada uno de los anticuerpos se muestra en esa Figura. Las regiones variables de cadena pesada de 14D12 (SEQ ID NO: 12) y 15F2 (SEQ ID NO: 13) son 99% idénticas, mientras que la región variable de cadena pesada de 90B4 (SEQ ID NO: 14) es solamente 40% idéntica a las regiones variables de cadena pesada de 14D12 y 15F2.

[0326] Una alineación de las regiones variables de cadena ligera, incluyendo una secuencia de consenso (SEQ ID NO: 19), se muestra en la Figura 48. La homología porcentual de las regiones variables de cadena ligera se muestra también. Las regiones variables de cadena ligera de 15F2 (SEQ ID NO: 17) y 90B4 (SEQ ID NO: 18) son 99% idénticas, mientras que las regiones variables de cadena ligera de 14D12 (SEQ ID NO: 16) es solamente 52% y 51% idéntica a las regiones variables de cadena ligera de 15F2 y 90B4, respectivamente.

AA. Mapeo de Epítopo de ciertos anticuerpos monoclonales contra ANGPTL4

[0327] Para identificar los epítomos para los anticuerpos monoclonales 15F2, 14D12, y 90B4, se realizó el siguiente experimento. Varios fragmentos de ANGPTL4 de ratón fueron traducidos *in vitro*. La ubicación de los fragmentos se muestra en la Tabla 5 y la secuencia de los fragmentos se muestra en la Tabla 6 (SEQ ID NOs: 40 a 48). El amino ácido de partida y amino ácido de terminación de la Tabla 5 se refiere a la secuencia de amino ácido de mANGPTL4 mostrada en la SEQ ID NO: 50.

Tabla 5

fragmento	amino ácido de partida	amino ácido de terminación
gs1	Q24	M73
gs2	L49	P98
gs3	A74	L123
gs4	E99	L151
gs5	F124	P180
gs1-2	L49	M73
gs2-3	A74	P98
gs3-4	E99	L123
gs4-5	F124	L151

[0328] Cada fragmento fue expresado como una construcción que fue generada usando PCR. Cada construcción derivada de PCR contenía un promotor T7, una secuencia que codifica una etiqueta His₆, una secuencia que codifica un modificador del tipo ubiquitina pequeño (SUMO), y la secuencia que codifica el fragmento de ANGPTL4. Las construcciones de PCR fueron traducidas *in vitro* usando El Conjunto de Generación de Plantilla Lineal de *E. coli* RTS (Linear Template Generation Set) (Roche Diagnostics) y el kit HY de *E. coli* RTS 100H (Roche Diagnostics), ambos como lo indica el fabricante. La porción de ANGPTL4 de un fragmento se refiere como "gs1," "gs2," etc., como se muestra en la Tabla 5. Los fragmentos de proteína traducidos *in vitro*, incluyendo la etiqueta His y la secuencia SUMO, son referidas como "His-SUMO-gs1," "His-SUMO-gs2," etc., como se muestra en la Figura 49.

151

[0329] Los fragmentos de proteína traducidos *in vitro* fueron separados en cuatro geles SDS-PAGE, junto con N-mANGPTL4, y transfectados a cuatro manchas de nitrocelulosa. Las manchas fueron entonces bloqueadas por 1 a 2 horas con TBS que contiene 5% de leche secada no grasa (TBS-NFDM). Después del bloqueo, las manchas fueron enjuagadas con TBS que contiene 0.5% de Tween-20 (TBS-Tween) cuatro veces por cinco minutos cada enjuague. Las manchas fueron entonces incubadas en TBS-NFDM que contiene el anticuerpo probador (14D12, 15F2, 90B4, o anti-His) durante la noche a 4°C. Las manchas fueron enjuagadas con TBS-Tween cuatro veces por cinco minutos cada enjuague y luego incubados en TBS-NFDM que contiene una dilución 1:6000 de anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a HRP (Southern Biotechnology Associates) por 1 hora. Las manchas fueron enjuagadas con TBS-Tween cuatro veces por cinco minutos cada enjuague y luego desarrolladas usando sustrato Quimioluminescente SuperSignal West Pico (Pierce Biotechnology) como lo dirige el fabricante. Alternativamente, las manchas pueden ser desarrolladas usando el Kil de Inmunodetección Western Breeze™ (Invitrogen).

[0330] Los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 49. El anticuerpo 14D12 se enlazó solamente a N-mANGPTL4 en ese experimento. 14D12 no pareció enlazarse a ninguno de los otros fragmentos en ese experimento. Este resultado puede deberse al hecho que 14D12 es un enlazante más débil que 15F2 y 90B4. Ver, p.e., Ejemplo S y Figura 33. El anticuerpo 15F2 se enlazó a His-SUMO-gs1. Ese resultado sugiere que 15F2 se enlaza al menos a una región entre Q24 y P98 de mANGPTL4 (SEQ ID NO: 40). El anticuerpo 90B4 se enlazó a His-SUMO-gs2 y His-SUMO-gs4. Ese resultado sugiere que el epítipo de 90B4 contiene porciones de mANGPTL4 entre L49 y P98 (SEQ ID NO: 41) y entre E99 y L151 (SEQ ID NO: 43).

BB. ARNsi

[0331] Los oligonucleótidos para uso como ARNsi fueron identificados usando el proceso SMARTselection™ (Dharmacon, Inc., Lafayette, CO). Este proceso usa un algoritmo de multi-componente para identificar ARNsi con una alta probabilidad de degradación potente y específica del ARNm objetivo. Se identificaron cuatro oligonucleótidos de ARN decatenarios para uso como

ARNsi usando este proceso. Las secuencias de los cuatro oligonucleótidos se indican en las SEQ ID NOs:5-8.

[0332] Los oligonucleótidos se usan para inducir la degradación, y por ende la expresión, de ARNm que codifica ANGPTL4 humana. Los cuatro oligonucleótidos son combinados en un solo reactivo, el reactivo SMARTpool® (Dharmacon, Inc., Lafayette, CO), que es resuspendido en una solución débil de RNasa amortiguada hasta una concentración final de aproximadamente 20µM. Los oligonucleótidos son transfectados en células cultivadas usando métodos de transfección estándar a una concentración de aproximadamente 1-200 nM de ARNsi.

[0333] Se usa un ensayo basado en célula para confirmar que los oligonucleótidos inducen la degradación de ARNm que codifica la ANGPTL4 humana *in vitro*. Células Hela transfectadas con los oligonucleótidos son sembradas en placas de 6 pozos y se dejaron crecer durante la noche en un incubador a 37°C con complemento de 5% de CO₂. La densidad de sembrado es de aproximadamente 100,000 células/pozo. Los oligonucleótidos son transfectados en células el día siguiente a una concentración final de aproximadamente 10-100 nM en 1 ml de medio de crecimiento. Las células son cosechadas 48 horas después de la transfección. El ARN total es aislado usando el kit Qiagen RNeasy kit. La cantidad de mRNA de Angptl4 es analizada mediante el análisis de inmunotransferencia tipo Northern.

[0334] Aunque los ejemplos anteriores describen, *inter alia*, ciertos anticuerpos monoclonales neutralizantes contra ANGPTL4 de ratón y los efectos *in vivo* de esos anticuerpos en ratones, el experto en la técnica reconocería fácilmente que los anticuerpos monoclonales neutralizantes contra ANGPTL4 humana pueden ser generados, y tales anticuerpos tendrían los mismos efectos o similares *in vivo* en humanos. Esa conclusión está basada, en parte, en la observación que la ANGPTL4 humana y de ratón son proteínas evolutivamente conservadas que comparten características estructurales y funcionales. Ver, p.e., Ge et al. (2004) J. Biol. Chem. 279:2038-2045. Por ejemplo, la ANGPTL4 humana y de ratón comparten aproximadamente 77% de identidad de secuencia de amino ácido. La ANGPTL4 humana y de ratón comparten elementos estructurales secundarios

comunes, p.e., un dominio de hélice enrollada N terminal y un dominio del tipo fibrinógeno C terminal. Adicionalmente, la ANGPTL4 humana tiene una function similar que la ANGPTL4 de ratón, demostrada por la habilidad de la ANGPTL4 humana para elevar los niveles de lípido en suero cuando está sobreexpresada en ratones. Ver Parte VI.B.2.

[0335] También se reconocerá generalmente en la técnica que los ratones se usan rutinariamente como modelos para el tratamiento de varias condiciones y enfermedades que usan anticuerpos neutralizantes. Por ejemplo, los anticuerpos neutralizantes se han usado para tratar la enfermedad prion, diabetes, y la inflamación en ratones. Ver, p.e., White et al. (2003) Nature 422:80-83; Cailleau et al. (1997) Diabetes 46:937-940; y Lochner et al. (2002) J. Immunol. Métodos 259:149-157. En el ultimo estudio, los anticuerpos monoclonales que neutralizan el IL-18 de ratón propagados en ratones deficientes de IL-18. Esos anticuerpos monoclonales de ratón fueron capaces de suprimir la respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacárido en ratones tipo nativo. Así, un experto en la técnica concluiría que los ejemplos anteriores sustentan el uso de anticuerpos monoclonales neutralizantes contra ANGPTL4 humana en el tratamiento de condiciones médicas humanas.

TABLA 6: Tabla de Secuencias

Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
ANGPTL4 de ratón (No. de Acceso NP_065606)	1	mrcaptagaa lvlcaatagl lsaqgrpaqp epprfaswde mnllahgllq lghglrehve rtrgqlgale mmaacgnac qgpkgkdapf kdsedrvpeg qtpetlqslq tqлкаanski qqlfqkvaqq qrylskqnlr iqnlqsqidl lapthldngv dktsrgkklk kmtqliglts nathlhrpar dcqelfqege rhsglfqiqp lgsppflvnc emtsdggwtv iqrrlngsvd fnqsweaykd gfgdpqgefz lglekmhsit gdrsgqlavq lqdwdgnakl lqfpihlgge dtayslqlte ptanelgatn vspnglslpf stwdqdhdlr gdlncaksls ggwwfgtcsn snlngqyfhs iprrqrerkk gifwktwkgr yyplqattll iqpmeataas
ANGPTL4 de ratón (Swiss-Prot. No. de Acceso Q9Z1P8)	50	MRCAPTAGAA LVLCAATAGL LSAQGRPAQP EPPRFASWDE MNLLAHGLLQ LGHGLREHVE RTRGQLGALE RRMAACGNAC QGPKGKDAPF KDSEDRVPEG QTPETLQSLQ TQLKAQNSKI QQLFQKVAQQ QRYLSKQNL R IQNLQSQIDL LAPTHLDNGV DKTSRGKRLP KMTQLIGLTP NATHLHRPPR DCQELFQEGE RHSGLFQIQP LGSPPFVLNC EMTSDGGWTV IQRRRLNGSVD FNQSWEAYKD GFGDPQGEFW LGLEKMHSIT GNRGSQ LAVQ LQDWDGNAKL LQFPIHLGGE DTAYSLQLTE PTANELGATN VSPNGLSLPF STWDQDHDLR GDLNCAKSLS GGWWFGTCSH SNLNGQYFHS IPRQRQERKK GIFWKTWKGR YYPLQATTLL IQPMEATAAS
ANGPTL4 humana (No. de Acceso NP_647475)	2	msgaptagaa lmlcaatavl lsaqggpvqs ksprfaswde mnvlahgllq lggglrehae rtrsqlsale rrsacgsac qgtegstldp lapesrvdpe vlhslqtqlk aqnsriqqf hkvaqqqrhl ekqhliqhl qsqfglldhk hldhevakpa rrrlpemaq pvdpahnvsv lhrprdcqe lfqvgerqsg lfeiqpqgsp pflvnckmts dggwtviqrr hdgsvdfnrv weaykagfgd phgefvlgle kvhsitgdrn srlavqlrdw dgnaellqfs vhlggedtay slqltapvag qlgattvpps glsvpfstwd qdhdllrdkn cakslsggww fgtcshsnln ggyfrsipqq rqlkkgifw ktwrgryypl qattmliqpm aaeaas
Angptl4 de ratón (No. de Acceso	3	gcaccagagc aagtctaagt ctgagccggc tccccagaa ctccagctgc tgggtcttga actcctgcgt tccggagtcc tagcgttgct gcaccaagg ccacccccag aatcatgcgc tgcgctccga

105

NM_020581) (ARNm/ADNc)		cagcaggcgc tgccctggtg ctatgcgcgg ctactgcggg gcttttgagc gctcaagggc gccctgcaca gccagagcca ccgcgctttg catcctggga cgagatgaac ttgctggctc acgggctgt acagctcggc catgggctgc gcgaacacgt ggagcgcacc cgtgggcagc tgggcgcgt ggagcgccgc atggctgcct gtgtaacgc ttgtcagggg cccaagggaa aagatgcacc cttaaagac tccgaggata gagtccttga aggccagact cctgagactc tgcagagttt gcagactcag ctcaaggctc aaaacagcaa gatccagcaa ttgtccaga aggtagccca gcagcagaga tacctatcaa agcagaatct gagaatacag aatcttcaga gccagataga cctcttgccc cccacgcacc tggacaatgg agtagacaag acttcgaggg gaaagaagct ttccaagatg acccagctca ttggcttgac ttccaacgcc acccacttac acaggccggc ccgggactgc caggaactct tccaagaagg ggagaggcac agtggacttt tccagatcca gcctctgggg tctccaccat ttttggtcaa ctgtgagatg acttcagatg gaggctggac agtgattcag agacgcctga acggctctgt ggacttcaac cagtcctggg aagcctacaa ggatggcttc ggagatcccc aaggcgagtt ctggctgggc ctggaaaaga tgcacagcat cacaggggac cgaggaagcc aattggctgt gcagctccag gactgggatg gcaatgccaa attgctcaa ttcccatcc atttgggggg ttaggacaca gcctacagcc tgcagctcac tgagcccacg gccaatgagc tgggtgccac caatgttcc cccaatggcc ttccctgcc ctctctact tgggaccaag accatgacct ccgtggggac cttaactgtg ccaagagcct ctctggggc tgggtggttg gtacctgtag ccattccaat ctaattggac aatacttcca ctctatccca cggcaacggc aggagcgtaa aaagggatc ttctggaaaa catggaaggg ccgtactat cctctgcagg ctaccaccct gttgatccag cccatggagg ctacagcagc ctcttagcct cctcactgga gcctggttcc aggcctaaga agacagtgc tttgggtgtg gccctgagat ttggccattc tctgctgggg gcaggagctc taagtagggc tatctgcgtc ttgtggacaa agaagaagcc cgtaactgga gagactggag gaccccttt ccgtgttggg gtctgaagc attgtgtct gaaacagtca gagcaacagg aaacaaatgg cccagatcca gaaaacatgg gctcgagggg cactgaatat cacttctcgc ctaccagaga agttagggat gcagagggac cactacagtc caactagctg ggccctaat ggcggactca gtcataatga ctgactggag acaggggtcc aggagccctg gatacactca tgggtctgtt gtaggtgctg ttgatgcaca ggtgctaact gtggttccca ggcacagctc acagcatctt tacaataaaa acaacctcag aacaacacaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa		
Angptl4 de ratón (No. de Acceso AF169313) (ARNm/ADNc)	49	GTTCCGGAGT	CCTAGCGTTG	CTGCACCCAA
		GGCCACCCCC	AGAATCATGC	GCTGCGCTCC
		GACAGCAGGC	GCTGCCCTGG	TGCTATGCGC
		GGCTACTGCG	GGGCTTTTGA	GCGCGCAAGG
		GCGCCCTGCA	CAGCCAGAGC	CACCGCGCTT
		TGCATCCTGG	GACGAGATGA	ACTTGCTGGC

		TCACGGGCTG CTACAGCTCG GCCATGGGCT GCGCGAACAC GTGGAGCGCA CCCGTGGGCA GCTGGGCGCG CTGGAGCGCC GCATGGCTGC CTGTGGTAAC GCTTGT CAGG GGGCCAAGGG AAAAGATGCA CCCTTCAAAG ACTCCGAGGA TAGAGTCCCT GAAGGCCAGA CTCCTGAGAC TCTGCAGAGT TTGCAGACTC AGCTCAAGGC TCAAAACAGC AAGATCCAGC AATTGTTCCA GAAGGTGGCC CAGCAGCAGA GATACCTATC AAAGCAGAAT CTGAGAATAC AGAATCTTCA GAGCCAGATA GACCTCTTGG CCCCCACGCA CCTAGACAAT GGAGTAGACA AGACTTCGAG GGGAAAGAGG CTCCCAAGA TGACCCAGCT CATTGGCTTG ACTCCCAACG CCACCCACTT ACACAGGCCG CCCC GGGACT GCCAGGAAC CTTCCAAGAA GGGGAGAGGC ACAGTGGACT TTTCCAGATC CAGCCTCTGG GGTCTCCACC ATTTTGGTC AACTGTGAGA TGACTTCAGA TGGAGGCTGG ACAGTGATTC AGAGACGCCT GAACGGCTCT GTGGACTTCA ACCAGTCCTG GGAAGCCTAC AAGGATGGCT TCGGAGATCC CCAAGGCGAG TTCTGGCTGG GCCTGGAAAA GATGCACAGC ATCACAGGGA ACCGAGGAAG CCAATTGGCT GTGCAGCTCC AGGACTGGGA TGGCAATGCC AAATTGCTCC AATTTCCCAT CCATTTGGGG GGTGAGGACA CAGCCTACAG CCTGCAGCTC ACTGAGCCCA CGGCCAATGA GCTGGGTGCC ACCAATGTTT CCCCCAATGG CCTTTCCCTG CCCTTCTCTA CTTGGGACCA AGACCATGAC CTCCGTGGGG ACCTTAACCTG TGCCAAGAGC CTCTCTGGTG GCTGGTGGTT TGGTACCTGT AGCCATTCCA ATCTCAATGG ACAATACTTC CACTCTATCC CACGGCAACG GCAGGAGCGT AAAAAGGGTA TCTTCTGGAA AACATGGAAG GGCCGCTACT ATCCTCTGCA GGCTACCACC CTGCTGATCC AGCCCATGGA GGCTACAGCA GCCTCTTAGC CTCCTCACTG GAGCCTGGTT CCAGGCTAAG AAG
Angptl4 humana (No. de Acceso NM_139314) (ARNm/ADNc)	4	ataaaaaccg tcctcgggcg cgccggggag aagccgagct gagcggatcc tcacacgact gtgatccgat tcttccagc ggctctgca accaagcggg tcttaccccc ggtcctccgc gtcctcagtc ctgcacctg gaacccaac gtccccgaga gtccccgaat ccccgctccc aggctaccta agaggatgag cggtgctccg acggccgggg

		cagccctgat gctctgcgcc gccaccgccg tgctactgag cgctcagggc ggaccctgtc agtccaagtc gccgcgcttt gcgtcctggg acgagatgaa tgtcctggcg cacggactcc tgcagctcgg ccaggggctg cggaacacg cggagcgcac ccgcagtcag ctgagcgcg tggagcggcg cctgagcgcg tgcgggtccg cctgtcaggg aaccgagggg tccaccgacc tcccgtagc ccctgagagc cgggtggacc ctgaggtcct tcacagcctg cagacacaac tcaaggctca gaacagcagg atccagcaac tctccacaa ggtggcccag cagcagcggc acctggagaa gcagcacctg cgaattcagc atctgcaaag ccagtttggc ctctggacc acaagcacct agaccatgag gtggccaagc ctgcccgaag aaagaggctg cccgagatgg cccagccagt tgaccgggt cacaatgtca gccgcctgca ccggtgccc agggattgcc aggagctgtt ccaggttggg gagaggcaga gtggactatt tgaaatccag cctcaggggt ctccgccatt ttggtgaac tgcaagatga cctcagatgg aggtggaca gtaattcaga ggcgccacga tggctcagt gactcaacc ggccctggga agcctacaag gcggggtttg gggatcccca cggcgagttc tggctgggtc tggagaaggt gcatagcatc acgggggacc gcaacagccg cctggccgtg cagctgcggg actgggatgg caacgccgag ttgctgcagt tctccgtgca cctgggtggc gaggacacgg cctatagcct gcagctcact gcacccgtgg ccggccagct gggcgccacc accgtccac ccagcggcct ctccgtaccc ttctccatt gggaccagga tcacgacctc cgcagggaca agaactgcgc caagagcctc tctggaggct ggtggttgg cacctgcagc cattccaacc tcaacggcca gtactccgc tccatccac agcagcggca gaagcttaag aagggaatct tctggaagac ctggcggggc cgctactacc cgctgcaggc caccaccatg ttgatccagc ccatggcagc agaggcagcc tctagcgtc ctggctgggc ctggtcccag gcccacgaaa gacggtgact ctggctctg cccgaggatg tggcgttcc ctgcctgggc aggggtcca aggaggggcc atctggaaac ttgtggacag agaagaagac cacgactgga gaagccccct ttctgagtgc aggggggctg catgcgttgc ctctgagat cgaggctgca ggatagtctc agactctaga ggcgtggacc aaggggcatg gagcttact cctgctggc cagggagttg gggactcaga gggaccactt ggggcccagcc agactggcct caatggcgga ctcagtcaca ttgactgacg gggaccaggg ctgtgtggg tcgagagcgc cctcatggtg ctggtgctgt tgtgtgtagg tccctgggg acacaagcag gcgccaatgg tatctgggcg gagctcacag agttcttga ataaaagcaa cctcagaaca cttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa
oligo 1 para ARNsi	5	GAGGCAGAGUGGACUAUUUUU
oligo 2 para	6	UUGGUGAACUGCAAGAUGAUU

ARNsi		
oligo 3 para ARNsi	7	GAUGGAGGCUGGACAGUAAUU
oligo 4 para ARNsi	8	GACAAGAACUGCGCCAAGAUU
péptido contra el cual se elevó 4A8	9	LAPTHLDNGVDKTSRGKR
N-mANGPTL4	10	MAMDIGINS D PQGRPAQPEP PRFASWDEM N LLAHG LLQLG HGLREHVERT RGQLGALERR MAACGNACQG PKGKDAPFKD SEDRVPEGQT PETLQSLQTQ LKAQNSKIQQ LFQKVAQQQR YLSKQNLRIQ NLQSQIDLLA PTHLDNGVDK TSRGKRLPKM TQLIGLTPLE HHHHHH
N-hANGPTL4	11	MAMDIGINS D PNSSSQGGPV QSKSPRFASW DEMNVLAHGL LQLGQGLREH AERTRSQLSA LERRLSACGS ACQGTEGST D LPLAPESRVD PEVLHSLQTQ LKAQNSRIQQ LFHKVAQQQR HLEKQHLRIQ HLQSQFGLLD HKHLDHEVAK PARRKRLPEM AQPVDPAHLE HHHHHH
Región variable de cadena pesada de 14D12	12	MNFGLSLIFL VLILKGVQCE VKLVESGGGL VKPGGSLKLS CAASGFAFSR YDMSWVRQTP EKRLWWATI STGGSYTYYP DSVKGRFTIS RDNARNTLYL QMGSLRSED T ALYFCVRHEQ STVVPHYPLD YWGQGTSVTV SSA
Región variable de cadena pesada de 15F2	13	MNFGLSLIFL VLILKGVQCE VKLVESGGGL VKPGGSLKLS CAASGFAFSR YDMSWVRQTP EKRLWWATI STDGSYTYYP DSVKGRFTIS RDNARNTLYL QMGSLRSED T ALYFCVRHEQ STIVPHYPLD YWGQGTSVTV SSA
Región variable de cadena pesada de 90B4	14	MGWSWIFLFL LSETAGVLSE VQLQQSGPEL MKPGASVKMS CRTSGYTFTD YSIHWWKQSH GKRLEWIGYI NPYNGDTYCD QNFKGKATLT FNKASSTAYM EIPRLTSDDS AVYYCTRWKT IQAPFAYWGQ GTLTVTSA
Concenso de región variable	15	MNFGLSLIFL VLILKGVQCE VKLVESGGGL YKPGGSLKLS CAASGFAFSR YDMSWVRQTP

de cadena pesada		EKRLEWWATI STXGSYTYYP DSVKGRFTIS RDNARNTLYL QMGLRSEDY ALYFCVRHEQ STIVPHYPLD YWGQGTSTVTV SSA
Región variable de cadena ligera de 14D12	16	MVSTSQLLGL LLFWTSASRC DIVMTQSPAT LSVTPGDRVS LSCRASQSIG DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSIDSVEP EDVGVYYCQN GHSFPFTFGS GTKLEIKR
Región variable de cadena ligera de 15F2	17	MDMRAPAQFL GILLWFPGA RCEIQMTQSP SSMSASLGDR ITITCQATQD IVKNLNWYQQ KPGKPPSFLI HYATELAEGV PSRFSGSGSG SDYSLTISNL ESEDFADYYC LQSYDFPYTF GGGTKLEINR
Región variable de cadena ligera de 90B4	18	MDMRAPAQFL GILLWFPGA RCEIQMTQSP SSMSASLGDR ITITCQATQD IVKNLNWYQQ KPGKPPSFLI HYATELAEGV PSRFSGSGSG SDYSLTISNL ESEDFADYYC LQSYDFPYTF GGGTKLEIN
Concenso de región variable de cadena ligera	19	RAPAQFLGIL LLWFGARCE IQMTQSPSSM SASLGDRITI TCQATQDIVK NLNHWYQQKPG KPPSFLIHYA TELAEGVPSR FSGSGSGSDY SLTISNLESE DFADYYCLQS YDFPYTFGGG TKLEINR
CDR1 de cadena pesada de 14D12	21	RYDMS
CDR2 de cadena pesada de 14D12	22	TISTGGSYTYYPDSVKG
CDR3 de cadena pesada de 14D12	23	RHEQSTVVPHYPL
CDR1 de cadena pesada de 15F2	24	RYDMS
CDR2 de cadena pesada de 15F2	25	TISTDGSYTYYPDSVKG

CDR3 de cadena pesada de 15F2	26	RHEQSTIVPHYPL
CDR1 de cadena pesada de 90B4	27	DYSIH
CDR2 de cadena pesada de 90B4	28	YINPYNGDTYCDQNFK
CDR3 de cadena pesada de 90B4	29	RWKTIQAPF
CDR1 de cadena ligera de 14D12	30	RASQSIGDYLN
CDR2 de cadena ligera de 14D12	31	YASQSIG
CDR3 de cadena ligera de 14D12	32	QNGHSFP
CDR1 de cadena ligera de 15F2	33	QATQDIVKNLN
CDR2 de cadena ligera de 15F2	34	YATELAE
CDR3 de cadena ligera de 15F2	35	LQSYDFP
CDR1 de cadena ligera de 90B4	36	QATQDIVKNLN
CDR2 de cadena ligera de 90B4	37	YATELAE

CDR3 de cadena ligera de 90B4	38	LQSYDFP
Concenso de CDR2 de cadena pesada de 14D12 y 15F2	39	TISTDXSYTYYPDSVKG
Concenso de CDR3 de cadena pesada de 14D12 y 15F2	20	RHEQSTXVPHYPL
fragmento gs-1 de mANGPTL4	40	QGRPAQPEPPRFASWDEMNLHAHGLLQLGHGLREHVE RTRGQLGALERRM
fragmento gs-2 de mANGPTL4	41	LQLGHGLREHVERTRGQLGALERRMAACGNAC QGPKGKDAPFKDSEDRVP
fragmento gs-3 de mANGPTL4	42	AACGNACQGPKGKDAPFKDSEDRVPEGQTPETLQSLQ TQLKAQNSKIQQL
fragmento gs4 de mANGPTL4	43	EGQTPETLQSLQTQLKAQNSKIQQLFQKVAQQ QRYLSKQNLRIQNLQSQIDLL
fragmento gs5 de mANGPTL4	44	FQKVAQQRYLSKQNLRIQNLQSQIDLLAPTHLDNGV DKTSRGKRLPKMTQLIGLTP
fragmento gs1-2 de mANGPTL4	45	LQLGHGLREHVERTRGQLGALERRM
fragmento gs2-3 de mANGPTL4	46	AACGNACQGPKGKDAPFKDSEDRVP
fragmento gs3-4 de mANGPTL4	47	EGQTPETLQSLQTQLKAQNSKIQQL
fragmento gs 4- 5 de mANGPTL4	48	FQKVAQQRYLSKQNLRIQNLQSQIDLL

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se enlaza específicamente a ANGPTL4 y neutraliza al menos una actividad de ANGPTL4.
2. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal de ratón.
3. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humanizado.
4. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humano.
5. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal aumenta la actividad de LPL.
6. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal disminuye el nivel de al menos un lípido en suero *in vivo*.
7. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal se enlaza a un epítipo dentro de una región de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 50 desde el residuo 21 al residuo 174.
8. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal se enlaza a un epítipo dentro de una región de la SEQ ID NO:2 desde el residuo 21 al residuo 169.
9. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal es 14D12.
10. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal es 90B4.
11. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal se enlaza específicamente al mismo epítipo que 14D12.

12. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal se enlaza específicamente al mismo epítipo que 15F2.
13. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal es un fragmento de anticuerpo.
14. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 13, en donde el anticuerpo monoclonal es un fragmento scFv.
15. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 13, en donde el anticuerpo monoclonal es un fragmento Fab.
16. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 13, en donde el anticuerpo monoclonal es un fragmento F(ab')₂.
17. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 13, en donde el anticuerpo monoclonal es un fragmento Fab'.
18. Unn anticuerpo que se enlaza específicamente a ANGPTL4, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende:
 - a) una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 12 a 14;
 - b) al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 21, 39, y 20; o
 - c) al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 27 a 29;en donde el anticuerpo neutraliza al menos una actividad de ANGPTL4.
19. El anticuerpo de la reivindicación 18, en donde la cadena ligera comprende:
 - a) una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 16 a 18;
 - b) al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 30 a 32; o

- c) al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 33 a 35.
20. El anticuerpo de la reivindicación 19, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 12 y en donde la cadena ligera comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 16.
21. El anticuerpo de la reivindicación 19, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 13 y en donde la cadena ligera comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 17.
22. El anticuerpo de la reivindicación 19, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 14 y en donde la cadena ligera comprende una secuencia de amino ácido como se indica en la SEQ ID NO: 18.
23. El anticuerpo de la reivindicación 19, en donde la cadena pesada comprende una CDR1 como se indica en la SEQ ID NO: 21, una CDR2 como se indica en la SEQ ID NO: 39, y una CDR3 como se indica en la SEQ ID NO: 20.
24. El anticuerpo de la reivindicación 19, en donde la cadena pesada comprende una CDR1 como se indica en la SEQ ID NO: 27, una CDR2 como se indica en la SEQ ID NO: 28, y una CDR3 como se indica en la SEQ ID NO: 29.
25. El anticuerpo de la reivindicación 19, en donde la cadena ligera comprende una CDR1 como se indica en la SEQ ID NO: 30, una CDR2 como se indica en la SEQ ID NO: 31, y una CDR3 como se indica en la SEQ ID NO: 32.
26. El anticuerpo de la reivindicación 19, en donde la cadena ligera comprende una CDR1 como se indica en la SEQ ID NO: 33, una CDR2 como se indica en la SEQ ID NO: 34, y una CDR3 como se indica en la SEQ ID NO: 35.

27. El anticuerpo de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal de ratón.
28. El anticuerpo de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humanizado.
29. El anticuerpo de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humano.
30. El anticuerpo de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo monoclonal aumenta la actividad de LPL.
31. El anticuerpo de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo monoclonal disminuye el nivel de al menos un lípido en suero *in vivo*.
32. El anticuerpo de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo monoclonal se enlaza a un epítopo dentro de una región de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 50 desde el residuo 21 al residuo 174.
33. El anticuerpo de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo monoclonal se enlaza a un epítopo dentro de una región de la SEQ ID NO:2 desde el residuo 21 al residuo 169.
34. El anticuerpo de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo monoclonal se enlaza específicamente al mismo epítopo que el anticuerpo 14D12.
35. El anticuerpo de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo monoclonal se enlaza específicamente al mismo epítopo que el anticuerpo 90B4.
36. El anticuerpo de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo monoclonal es un fragmento de anticuerpo.
37. El anticuerpo de la reivindicación 36, en donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento scFv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, o un fragmento Fab'.
38. Un anticuerpo que se enlaza específicamente a ANGPTL4, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende:

- a) una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 16 a 18;
- b) al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 30 a 32; o
- c) al menos una CDR que comprende una secuencia de amino ácido como se indica en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 33 a 35;

en donde el anticuerpo neutraliza al menos una actividad de ANGPTL4.

- 39. El anticuerpo de la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal de ratón.
- 40. El anticuerpo de la reivindicación 39, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humanizado.
- 41. El anticuerpo de la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humano.
- 42. El anticuerpo de la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal aumenta la actividad de LPL.
- 43. El anticuerpo de la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal disminuye el nivel de al menos un lípido en suero *in vivo*.
- 44. El anticuerpo de la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal se enlaza a un epítipo dentro de una región de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 50 desde el residuo 21 al residuo 174.
- 45. El anticuerpo de la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal se enlaza a un epítipo dentro de una región de la SEQ ID NO:2 desde el residuo 21 al residuo 169.
- 46. El anticuerpo de la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal se enlaza específicamente al mismo epítipo que 14D12.
- 47. El anticuerpo de la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal se enlaza específicamente al mismo epítipo que 90B4.

48. El anticuerpo de la reivindicación 38, en donde el anticuerpo monoclonal es un fragmento de anticuerpo.
49. El anticuerpo de la reivindicación 48, en donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento scFv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, o un fragmento Fab'.
50. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se enlaza a un péptido de la SEQ ID NO: 40.
51. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se enlaza a un péptido de la SEQ ID NO: 41.
52. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se enlaza a un péptido de la SEQ ID NO: 43.
53. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se enlaza a un péptido de la SEQ ID NO: 41 y se enlaza a un péptido de la SEQ ID NO: 43.
54. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1-53.
55. Un método para el tratamiento de un trastorno del metabolismo de lípido que comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 54.
56. Un método para disminuir el nivel en suero de uno o más lípidos que comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 54.
57. Un método para el tratamiento de la hipertrigliceridemia que comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 54.
58. Un método para el tratamiento de la hipercolesterolemia que comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 54.

59. Un método para el tratamiento de la obesidad que comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 54.
60. Un método para el tratamiento de la diabetes que comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 54.
61. Un método para el tratamiento de la enfermedad cardíaca isquémica que comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 54.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Lexicon Genetics Incorporated
 Lee, E-Chiang
 Landes, Gregory
 Chung, Kyu
 Chen, Ling
 Desai, Urvi
 Powell, David Reed
 Hong, Seokjoo

<120> ANTICUERPO MONOCLONAL CONTRA ANGPTL4

<130> 7705.24-304

<150> 60/642,022

<151> 2005-01-07

<160> 50

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 410

<212> PRT

<213> Músculo

<400> 1

Met Arg Cys Ala Pro Thr Ala Gly Ala Ala Leu Val Leu Cys Ala Ala
 1 5 10 15

Thr Ala Gly Leu Leu Ser Ala Gln Gly Arg Pro Ala Gln Pro Glu Pro
 20 25 30

Pro Arg Phe Ala Ser Trp Asp Glu Met Asn Leu Leu Ala His Gly Leu
 35 40 45

Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Arg Glu His Val Glu Arg Thr Arg Gly
 50 55 60

Gln Leu Gly Ala Leu Glu Arg Arg Met Ala Ala Cys Gly Asn Ala Cys
 65 70 75 80

Gln Gly Pro Lys Gly Lys Asp Ala Pro Phe Lys Asp Ser Glu Asp Arg
 85 90 95

Val Pro Glu Gly Gln Thr Pro Glu Thr Leu Gln Ser Leu Gln Thr Gln
 100 105 110

Leu Lys Ala Gln Asn Ser Lys Ile Gln Gln Leu Phe Gln Lys Val Ala
 115 120 125

Gln Gln Gln Arg Tyr Leu Ser Lys Gln Asn Leu Arg Ile Gln Asn Leu
 130 135 140

Gln Ser Gln Ile Asp Leu Leu Ala Pro Thr His Leu Asp Asn Gly Val
 145 150 155 160

Asp Lys Thr Ser Arg Gly Lys Lys Leu Ser Lys Met Thr Gln Leu Ile
 165 170 175
 Gly Leu Thr Ser Asn Ala Thr His Leu His Arg Pro Ala Arg Asp Cys
 180 185 190
 Gln Glu Leu Phe Gln Glu Gly Glu Arg His Ser Gly Leu Phe Gln Ile
 195 200 205
 Gln Pro Leu Gly Ser Pro Pro Phe Leu Val Asn Cys Glu Met Thr Ser
 210 215 220
 Asp Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Arg Arg Leu Asn Gly Ser Val Asp
 225 230 235 240
 Phe Asn Gln Ser Trp Glu Ala Tyr Lys Asp Gly Phe Gly Asp Pro Gln
 245 250 255
 Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Met His Ser Ile Thr Gly Asp
 260 265 270
 Arg Gly Ser Gln Leu Ala Val Gln Leu Gln Asp Trp Asp Gly Asn Ala
 275 280 285
 Lys Leu Leu Gln Phe Pro Ile His Leu Gly Gly Glu Asp Thr Ala Tyr
 290 295 300
 Ser Leu Gln Leu Thr Glu Pro Thr Ala Asn Glu Leu Gly Ala Thr Asn
 305 310 315 320
 Val Ser Pro Asn Gly Leu Ser Leu Pro Phe Ser Thr Trp Asp Gln Asp
 325 330 335
 His Asp Leu Arg Gly Asp Leu Asn Cys Ala Lys Ser Leu Ser Gly Gly
 340 345 350
 Trp Trp Phe Gly Thr Cys Ser His Ser Asn Leu Asn Gly Gln Tyr Phe
 355 360 365
 His Ser Ile Pro Arg Gln Arg Gln Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Trp
 370 375 380
 Lys Thr Trp Lys Gly Arg Tyr Tyr Pro Leu Gln Ala Thr Thr Leu Leu
 385 390 395 400
 Ile Gln Pro Met Glu Ala Thr Ala Ala Ser
 405 410

<210> 2
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

171

<400> 2

Met Ser Gly Ala Pro Thr Ala Gly Ala Ala Leu Met Leu Cys Ala Ala
1 5 10 15
Thr Ala Val Leu Leu Ser Ala Gln Gly Gly Pro Val Gln Ser Lys Ser
20 25 30
Pro Arg Phe Ala Ser Trp Asp Glu Met Asn Val Leu Ala His Gly Leu
35 40 45
Leu Gln Leu Gly Gln Gly Leu Arg Glu His Ala Glu Arg Thr Arg Ser
50 55 60
Gln Leu Ser Ala Leu Glu Arg Arg Leu Ser Ala Cys Gly Ser Ala Cys
65 70 75 80
Gln Gly Thr Glu Gly Ser Thr Asp Leu Pro Leu Ala Pro Glu Ser Arg
85 90 95
Val Asp Pro Glu Val Leu His Ser Leu Gln Thr Gln Leu Lys Ala Gln
100 105 110
Asn Ser Arg Ile Gln Gln Leu Phe His Lys Val Ala Gln Gln Gln Arg
115 120 125
His Leu Glu Lys Gln His Leu Arg Ile Gln His Leu Gln Ser Gln Phe
130 135 140
Gly Leu Leu Asp His Lys His Leu Asp His Glu Val Ala Lys Pro Ala
145 150 155 160
Arg Arg Lys Arg Leu Pro Glu Met Ala Gln Pro Val Asp Pro Ala His
165 170 175
Asn Val Ser Arg Leu His Arg Leu Pro Arg Asp Cys Gln Glu Leu Phe
180 185 190
Gln Val Gly Glu Arg Gln Ser Gly Leu Phe Glu Ile Gln Pro Gln Gly
195 200 205
Ser Pro Pro Phe Leu Val Asn Cys Lys Met Thr Ser Asp Gly Gly Trp
210 215 220
Thr Val Ile Gln Arg Arg His Asp Gly Ser Val Asp Phe Asn Arg Pro
225 230 235 240
Trp Glu Ala Tyr Lys Ala Gly Phe Gly Asp Pro His Gly Glu Phe Trp
245 250 255
Leu Gly Leu Glu Lys Val His Ser Ile Thr Gly Asp Arg Asn Ser Arg
260 265 270

Leu Ala Val Gln Leu Arg Asp Trp Asp Gly Asn Ala Glu Leu Leu Gln
 275 280 285
 Phe Ser Val His Leu Gly Gly Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Leu Gln Leu
 290 295 300
 Thr Ala Pro Val Ala Gly Gln Leu Gly Ala Thr Thr Val Pro Pro Ser
 305 310 315 320
 Gly Leu Ser Val Pro Phe Ser Thr Trp Asp Gln Asp His Asp Leu Arg
 325 330 335
 Arg Asp Lys Asn Cys Ala Lys Ser Leu Ser Gly Gly Trp Trp Phe Gly
 340 345 350
 Thr Cys Ser His Ser Asn Leu Asn Gly Gln Tyr Phe Arg Ser Ile Pro
 355 360 365
 Gln Gln Arg Gln Lys Leu Lys Lys Gly Ile Phe Trp Lys Thr Trp Arg
 370 375 380
 Gly Arg Tyr Tyr Pro Leu Gln Ala Thr Thr Met Leu Ile Gln Pro Met
 385 390 395 400
 Ala Ala Glu Ala Ala Ser
 405

<210> 3
 <211> 1858
 <212> ADH
 <213> Músculo

<400> 3
 gcaccagagc aagtctaagt ctgagccggc tccccagaa ctccagctgc tgggtcttga 60
 actcctgcgt tccggagtcc tagcgttgct gcacccaagg ccacccccag aatcatgcgc 120
 tgcgctccga cagcaggcgc tgccctggtg ctatgcgcgg ctactgcggg gcttttgagc 180
 gctcaagggc gccctgcaca gccagagcca ccgcgctttg catcctggga cgagatgaac 240
 ttgctggctc acgggctgct acagctcggc catgggctgc gcgaacacgt ggagcgcacc 300
 cgtgggcagc tgggcgcgct ggagcgcgc atggctgcct gtggtaacgc ttgtcagggg 360
 cccaaggga aagatgcacc cttcaaagac tccgaggata ggtccctga aggccagact 420
 cctgagactc tgcagagttt gcagactcag ctcaaggctc aaaacagcaa gatccagcaa 480
 ttgttccaga aggtggccca gcagcagaga tacctatcaa agcagaatct gagaatacag 540
 aatcttcaga gccagataga cctcttgccc cccacgcacc tggacaatgg agtagacaag 600
 acttcgaggg gaaagaagct ttccaagatg acccagctca ttggcttgac ttccaacgcc 660
 acccacttac acaggccggc ccgggactgc caggaactct tccaagaagg ggagaggcac 720
 agtggacttt tccagatcca gcctctgggg tctccaccat ttttgggtcaa ctgtgagatg 780

acttcagatg gaggctggac agtgattcag agacgcctga acggctctgt ggacttcaac	840
cagtcctggg aagcctacaa ggatggcttc ggagatcccc aaggcgagtt ctggctgggc	900
ctggaaaaga tgcacagcat cacaggggac cgaggaagcc aattggctgt gcagctccag	960
gactgggatg gcaatgccaa attgctccaa tttcccatcc atttgggggg tgaggacaca	1020
gcctacagcc tgcagctcac tgagcccacg gccaatgagc tgggtgccac caatgtttcc	1080
cccaatggcc tttccctgcc cttctctact tgggaccaag accatgacct ccgtggggac	1140
cttaactgtg ccaagagcct ctctggtggc tgggtggttg gtacctgtag ccattccaat	1200
ctcaatggac aatacttcca ctctatccca cggcaacggc aggagcgtaa aaagggatc	1260
ttctggaaaa catggaaggc ccgtactat cctctgcagg ctaccacct gttgatccag	1320
cccatggagg ctacagcagc ctcttagcct cctcactgga gcctggttcc aggcctaaga	1380
agacagtgac tttggttggt gccctgagat ttggccattc tctgctgggg gcaggagctc	1440
taagtagggc tatctgcgtc ttgtggacaa agaagaagcc cgtaactgga gagactggag	1500
gacccctttt ccgtgttggg gtctgcaagc attgttgtct gaaacagtca gagcaacagg	1560
aaacaaatgg ccagatcca gaaaacatgg gctcgagggg cactgaatat cacttctcgc	1620
ctaccagaga agttggggat gcagagggac cactacagtc caactagctg ggccctaat	1680
ggcggactca gtcataattga ctgactggag acagggtgcc aggagccctg gatacactca	1740
tgggtgtgtt gtaggtgctg tggatgcaca ggtgctaact gtggttccca ggcacagctc	1800
acagcattct tacaataaaa acaacctcag aacaaaacaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa	1858

<210> 4
 <211> 1967
 <212> ADH
 <213> Homo sapiens

<400> 4	
ataaaaaccg tcctcgggag cggcggggag aagccgagct gagcggatcc tcacacgact	60
gtgatccgat tctttccagc ggcttctgca accaagcggg tcttaccccc ggtcctccgc	120
gtctccagtc ctgcacctg gaaccccaac gtccccgaga gtccccgaat ccccgctccc	180
aggctaccta agaggatgag cgggtgctccg acggccgggg cagccctgat gctctgcgcc	240
gccaccgccg tgctactgag cgctcagggc ggacccgtgc agtccaagtc gccgcgcttt	300
gcgtcctggg acgagatgaa tgtcctggcg caggactcc tgagctcgg ccaggggctg	360
cgcgaacacg cggagcgac ccgcagtcag ctgagcgcgc tggagcggcg cctgagcgcg	420
tgcgggtccg cctgtcaggg aaccgagggg tccaccgacc tcccgttagc ccctgagagc	480
cgggtggacc ctgaggctct tcacagcctg cagacacaac tcaaggctca gaacagcagg	540
atccagcaac tcttccacaa ggtggcccag cagcagcggc acctggagaa gcagcacctg	600
cgaattcagc atctgcaaag ccagtttggc ctcttgacc acaagcacct agaccatgag	660
gtggccaagc ctgcccgaag aaagaggctg ccgagatgg ccagccagt tgaccggct	720
cacaatgtca gccgcctgca ccggctgccc agggattgcc aggagctgtt ccaggttggg	780

174

gagaggcaga gtggactatt tgaaatccag cctcaggggt ctccgccatt tttggtgaac	840
tgcaagatga cctcagatgg aggctggaca gtaattcaga ggcgccacga tggctcagt	900
gacttcaacc ggccctggga agcctacaag gcggggtttg gggatcccca cggcgagttc	960
tggctgggtc tggagaaggt gcatagcatc acgggggacc gcaacagccg cctggccgtg	1020
cagctgcggg actgggatgg caacgccgag ttgctgcagt tctccgtgca cctgggtggc	1080
gaggacacgg cctatagcct gcagctcact gcacccgtgg ccggccagct ggcgccacc	1140
accgtccac ccagcggcct ctccgtaccc ttctccactt gggaccagga tcacgacctc	1200
cgcagggaca agaactgccc caagagcctc tctggaggct ggtggtttgg cacctgcagc	1260
cattccaacc tcaacggcca gtacttccgc tccatccac agcagcggca gaagcttaag	1320
aagggaatct tctggaagac ctggcggggc cgctactacc cgctgcaggc caccaccatg	1380
ttgatccagc ccatggcagc agaggcagcc tcttagcgtc ctggctgggc ctgggtccag	1440
gcccacgaaa gacggtgact cttggctctg cccgaggatg tggccgttcc ctgcctgggc	1500
aggggctcca aggaggggcc atctggaaac ttgtggacag agaagaagac cagcactgga	1560
gaagccccct ttctgagtgc aggggggctg catgcgttgc ctctgagat cgaggctgca	1620
ggatatgctc agactctaga ggcgtggacc aaggggcatg gagcttcact ccttgcctggc	1680
cagggagttg gggactcaga gggaccactt ggggccagcc agactggcct caatggcgga	1740
ctcagtcaca ttgactgacg gggaccaggg cttgtgtggg tgcagagcgc cctcatggtg	1800
ctggtgctgt tgtgtgtagg tcccctgggg acacaagcag gcgccaatgg tatctgggcg	1860
gagctcacag agttcttggg ataaaagcaa cctcagaaca cttaaaaaaa aaaaaaaaaa	1920
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	1967

<210> 5
 <211> 21
 <212> ARH
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido para ARNsi

<400> 5	
gaggcagagu ggacuauuuu u	21

<210> 6
 <211> 21
 <212> ARH
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido para ARNsi

<400> 6	
uuggugaacu gcaaugau u	21

<210> 7
 <211> 21
 <212> ARH
 <213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para ARNsi

<400> 7
gauggaggcu ggacaguaau u

21

<210> 8
<211> 21
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido para ARNsi

<400> 8
gacaagaacu gcgccaagau u

21

<210> 9
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido para inmunización

<400> 9

Leu Ala Pro Thr His Leu Asp Asn Gly Val Asp Lys Thr Ser Arg Gly
1 5 10 15

Lys Arg

<210> 10
<211> 176
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína de fusión

<400> 10

Met Ala Met Asp Ile Gly Ile Asn Ser Asp Pro Gln Gly Arg Pro Ala
1 5 10 15

Gln Pro Glu Pro Pro Arg Phe Ala Ser Trp Asp Glu Met Asn Leu Leu
20 25 30

Ala His Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Arg Glu His Val Glu
35 40 45

Arg Thr Arg Gly Gln Leu Gly Ala Leu Glu Arg Arg Met Ala Ala Cys
50 55 60

Gly Asn Ala Cys Gln Gly Pro Lys Gly Lys Asp Ala Pro Phe Lys Asp
65 70 75 80

Ser Glu Asp Arg Val Pro Glu Gly Gln Thr Pro Glu Thr Leu Gln Ser

	85		90		95
Leu	Gln Thr	Gln Leu Lys Ala Gln	Asn Ser Lys Ile Gln Gln	Leu Phe	
	100		105	110	
Gln Lys Val	Ala Gln Gln Gln Arg Tyr	Leu Ser Lys Gln	Asn Leu Arg		
	115	120	125		
Ile Gln	Asn Leu Gln Ser Gln Ile	Asp Leu Leu Ala	Pro Thr His Leu		
	130	135	140		
Asp Asn Gly Val	Asp Lys Thr Ser Arg Gly	Lys Arg Leu Pro Lys	Met		
145	150	155	160		
Thr Gln Leu Ile	Gly Leu Thr Pro Leu	Glu His His His His	His		
	165	170	175		

<210> 11
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> proteína de fusión

 <400> 11

Met Ala Met Asp Ile Gly Ile Asn Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ser Gln	
1 5 10 15	
Gly Gly Pro Val Gln Ser Lys Ser Pro Arg Phe Ala Ser Trp Asp Glu	
20 25 30	
Met Asn Val Leu Ala His Gly Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Leu Arg	
35 40 45	
Glu His Ala Glu Arg Thr Arg Ser Gln Leu Ser Ala Leu Glu Arg Arg	
50 55 60	
Leu Ser Ala Cys Gly Ser Ala Cys Gln Gly Thr Glu Gly Ser Thr Asp	
65 70 75 80	
Leu Pro Leu Ala Pro Glu Ser Arg Val Asp Pro Glu Val Leu His Ser	
85 90 95	
Leu Gln Thr Gln Leu Lys Ala Gln Asn Ser Arg Ile Gln Gln Leu Phe	
100 105 110	
His Lys Val Ala Gln Gln Gln Arg His Leu Glu Lys Gln His Leu Arg	
115 120 125	
Ile Gln His Leu Gln Ser Gln Phe Gly Leu Leu Asp His Lys His Leu	
130 135 140	

Asp His Glu Val Ala Lys Pro Ala Arg Arg Lys Arg Leu Pro Glu Met
145 150 155 160

Ala Gln Pro Val Asp Pro Ala His Leu Glu His His His His His His
165 170 175

<210> 12
<211> 143
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 12

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
35 40 45

Ser Arg Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn
85 90 95

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

Tyr Phe Cys Val Arg His Glu Gln Ser Thr Val Val Pro His Tyr Pro
115 120 125

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140

<210> 13
<211> 143
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 13

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
35 40 45

AB

Ser Arg Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Thr Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Val Arg His Glu Gln Ser Thr Ile Val Pro His Tyr Pro
 115 120 125
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140
 <210> 14
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Músculo
 <400> 14
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Glu Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Arg Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Ser Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Tyr Cys Asp
 65 70 75 80
 Gln Asn Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Phe Asn Lys Ala Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Ile Pro Arg Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Lys Thr Ile Gln Ala Pro Phe Ala Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135

<210> 15

179

<211> 143
<212> PRT
<213> Músculo

<220>
<221> misc_feature
<222> (73)..(73)
<223> Xaa puede ser cualquier amino ácido que se encuentra naturalmente
<400> 15

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
35 40 45

Ser Arg Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Thr Xaa Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn
85 90 95

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

Tyr Phe Cys Val Arg His Glu Gln Ser Thr Ile Val Pro His Tyr Pro
115 120 125

Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140

<210> 16
<211> 128
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 16

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

Ala Ser Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Ile Gly Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asp
85 90 95

Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His
100 105 110

Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

<210> 17
<211> 130
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 17

Met Asp Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Glu Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Met Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Thr
35 40 45

Gln Asp Ile Val Lys Asn Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Pro Pro Ser Phe Leu Ile His Tyr Ala Thr Glu Leu Ala Glu Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln
100 105 110

Ser Tyr Asp Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Asn Arg
130

<210> 18
<211> 129
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 18

Met Asp Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15
 Phe Pro Gly Ala Arg Cys Glu Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Met Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Thr
 35 40 45
 Gln Asp Ile Val Lys Asn Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 Pro Pro Ser Phe Leu Ile His Tyr Ala Thr Glu Leu Ala Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Asn Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln
 100 105 110
 Ser Tyr Asp Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Asn

<210> 19
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Músculo

<400> 19

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

Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
115 120 125

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> Músculo

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa puede ser cualquier amino ácido que se encuentra naturalmente
<400> 20

Arg His Glu Gln Ser Thr Xaa Val Pro His Tyr Pro Leu
1 5 10

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 21

Arg Tyr Asp Met Ser
1 5

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 22

Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 23
<211> 13
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 23

Arg His Glu Gln Ser Thr Val Val Pro His Tyr Pro Leu
1 5 10

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 24

Arg Tyr Asp Met Ser
1 5

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 25

Thr Ile Ser Thr Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 26

Arg His Glu Gln Ser Thr Ile Val Pro His Tyr Pro Leu
1 5 10

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 27

Asp Tyr Ser Ile His
1 5

<210> 28
<211> 16
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 28

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

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 29

Arg Trp Lys Thr Ile Gln Ala Pro Phe
1 5

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asp Tyr Leu His
1 5 10

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 31

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 32

Gln Asn Gly His Ser Phe Pro
1 5

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 33

Gln Ala Thr Gln Asp Ile Val Lys Asn Leu Asn
1 5 10

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 34

Tyr Ala Thr Glu Leu Ala Glu
1 5

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 35

Leu Gln Ser Tyr Asp Phe Pro
1 5

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 36

Gln Ala Thr Gln Asp Ile Val Lys Asn Leu Asn
1 5 10

<210> 37

<211> 7
<212> PRT
<213> Músculo
<400> 37

Tyr Ala Thr Glu Leu Ala Glu
1 5

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Músculo
<400> 38

Leu Gln Ser Tyr Asp Phe Pro
1 5

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> Músculo

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser cualquier amino ácido que se encuentra naturalmente
<400> 39

Thr Ile Ser Thr Asp Xaa Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 40
<211> 50
<212> PRT
<213> Músculo
<400> 40

Gln Gly Arg Pro Ala Gln Pro Glu Pro Arg Phe Ala Ser Trp Asp
1 5 10 15

Glu Met Asn Leu Leu Ala His Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
20 25 30

Arg Glu His Val Glu Arg Thr Arg Gly Gln Leu Gly Ala Leu Glu Arg
35 40 45

Arg Met
50

<210> 41
<211> 50
<212> PRT
<213> Músculo

<400> 41

Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Arg Glu His Val Glu Arg Thr Arg Gly
1 5 10 15

Gln Leu Gly Ala Leu Glu Arg Arg Met Ala Ala Cys Gly Asn Ala Cys
20 25 30

Gln Gly Pro Lys Gly Lys Asp Ala Pro Phe Lys Asp Ser Glu Asp Arg
35 40 45

Val Pro
50

<210> 42

<211> 50

<212> PRT

<213> Músculo

<400> 42

Ala Ala Cys Gly Asn Ala Cys Gln Gly Pro Lys Gly Lys Asp Ala Pro
1 5 10 15

Phe Lys Asp Ser Glu Asp Arg Val Pro Glu Gly Gln Thr Pro Glu Thr
20 25 30

Leu Gln Ser Leu Gln Thr Gln Leu Lys Ala Gln Asn Ser Lys Ile Gln
35 40 45

Gln Leu
50

<210> 43

<211> 53

<212> PRT

<213> Músculo

<400> 43

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

Ala Gln Asn Ser Lys Ile Gln Gln Leu Phe Gln Lys Val Ala Gln Gln
20 25 30

Gln Arg Tyr Leu Ser Lys Gln Asn Leu Arg Ile Gln Asn Leu Gln Ser
35 40 45

Gln Ile Asp Leu Leu
50

<210> 44

<211> 57

<212> PRT

<213> Músculo

<400> 44

Phe Gln Lys Val Ala Gln Gln Gln Arg Tyr Leu Ser Lys Gln Asn Leu
1 5 10 15

Arg Ile Gln Asn Leu Gln Ser Gln Ile Asp Leu Leu Ala Pro Thr His
20 25 30

Leu Asp Asn Gly Val Asp Lys Thr Ser Arg Gly Lys Arg Leu Pro Lys
35 40 45

Met Thr Gln Leu Ile Gly Leu Thr Pro
50 55

<210> 45

<211> 25

<212> PRT

<213> Músculo

<400> 45

Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Arg Glu His Val Glu Arg Thr Arg Gly
1 5 10 15

Gln Leu Gly Ala Leu Glu Arg Arg Met
20 25

<210> 46

<211> 25

<212> PRT

<213> Músculo

<400> 46

Ala Ala Cys Gly Asn Ala Cys Gln Gly Pro Lys Gly Lys Asp Ala Pro
1 5 10 15

Phe Lys Asp Ser Glu Asp Arg Val Pro
20 25

<210> 47

<211> 25

<212> PRT

<213> Músculo

<400> 47

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

Ala Gln Asn Ser Lys Ile Gln Gln Leu
20 25

<210> 48

<211> 28

<212> PRT

<213> Músculo

ABB

<400> 48

Phe Gln Lys Val Ala Gln Gln Gln Arg Tyr Leu Ser Lys Gln Asn Leu
1 5 10 15

Arg Ile Gln Asn Leu Gln Ser Gln Ile Asp Leu Leu
20 25

<210> 49

<211> 1313

<212> ADN

<213> Músculo

<400> 49

```
gttccggagt cctagcgttg ctgcacccaa ggccaccccc agaatcatgc gctgcgctcc 60
gacagcaggc gctgcccttg tgctatgcgc ggctactgcg gggcttttga gcgcgcaagg 120
gcgccctgca cagccagagc caccgcgctt tgcctccttg gacgagatga acttgctggc 180
tcacgggctg ctacagctcg gccatgggct gcgcgaacac gtggagcgca cccgtgggca 240
gctgggcgcg ctggagcgcc gcatggctgc ctgtggtaac gcttgtcagg ggcccaaggg 300
aaaagatgca cccttcaaag actccgagga tagagtccct gaaggccaga ctctgagac 360
tctgcagagt ttgcagactc agctcaaggc tcaaaacagc aagatccagc aattgttcca 420
gaagggtggc cagcagcaga gatacctatc aaagcagaat ctgagaatac agaatttcca 480
gagccagata gacctcttg cccccacgca cctagacaat ggagtagaca agacttcgag 540
gggaaagagg cttcccaaga tgaccagct cattggcttg actcccaacg ccaccactt 600
acacaggccg ccccgggact gccaggaact cttccaagaa ggggagaggc acagtggact 660
tttcagatc cagcctcttg ggtctccacc atttttggtc aactgtgaga tgacttcaga 720
tggaggcttg acagtgattc agagacgcct gaacggctct gtggacttca accagtctg 780
ggaagcctac aaggatggct tcggagatcc ccaaggcgag ttctggctgg gcctggaaaa 840
gatgcacagc atcacagga accgaggaag ccaattggct gtgcagctcc aggactggga 900
tggcaatgcc aaattgctcc aatttcccat ccatttgggg ggtgaggaca cagcctacag 960
cctgcagctc actgagccca cggccaatga gctgggtgcc accaatgttt cccccaatgg 1020
cctttccctg cctttctcta cttgggacca agaccatgac ctccgtgggg accttaactg 1080
tgccaagagc ctctctggtg gctggtggtt tggtagctgt agccattcca atctcaatgg 1140
acaatacttc cactctatcc caccgcaacg gcaggagcgt aaaaagggtg tcttctggaa 1200
aacatggaag ggccgctact atcctctgca ggctaccaac ctgctgatcc agcccatgga 1260
ggctacagca gcctcttagc ctctcactg gagcctgggt ccaggctaag aag 1313
```

<210> 50

<211> 410

<212> PRT

<213> Músculo

<400> 50

Met Arg Cys Ala Pro Thr Ala Gly Ala Ala Leu Val Leu Cys Ala Ala

1	5	10	15
Thr Ala Gly	Leu Leu Ser Ala Gln	Gly Arg Pro Ala Gln	Pro Glu Pro
	20	25	30
Pro Arg Phe	Ala Ser Trp Asp	Glu Met Asn Leu Leu	Ala His Gly Leu
	35	40	45
Leu Gln Leu	Gly His Gly Leu	Arg Glu His Val	Glu Arg Thr Arg Gly
	50	55	60
Gln Leu Gly	Ala Leu Glu Arg Arg	Met Ala Ala Cys	Gly Asn Ala Cys
	65	70	75
Gln Gly Pro	Lys Gly Lys Asp	Ala Pro Phe Lys Asp	Ser Glu Asp Arg
	85	90	95
Val Pro Glu	Gly Gln Thr Pro	Glu Thr Leu Gln Ser	Leu Gln Thr Gln
	100	105	110
Leu Lys Ala	Gln Asn Ser Lys	Ile Gln Gln Leu Phe	Gln Lys Val Ala
	115	120	125
Gln Gln Gln	Arg Tyr Leu Ser	Lys Gln Asn Leu Arg	Ile Gln Asn Leu
	130	135	140
Gln Ser Gln	Ile Asp Leu Leu	Ala Pro Thr His	Leu Asp Asn Gly Val
	145	150	155
Asp Lys Thr	Ser Arg Gly Lys	Arg Leu Pro Lys	Met Thr Gln Leu Ile
	165	170	175
Gly Leu Thr	Pro Asn Ala Thr	His Leu His Arg	Pro Pro Arg Asp Cys
	180	185	190
Gln Glu Leu	Phe Gln Glu Gly	Glu Arg His Ser	Gly Leu Phe Gln Ile
	195	200	205
Gln Pro Leu	Gly Ser Pro Pro	Phe Leu Val Asn	Cys Glu Met Thr Ser
	210	215	220
Asp Gly Gly	Trp Thr Val Ile	Gln Arg Arg Leu	Asn Gly Ser Val Asp
	225	230	235
Phe Asn Gln	Ser Trp Glu Ala	Tyr Lys Asp Gly	Phe Gly Asp Pro Gln
	245	250	255
Gly Glu Phe	Trp Leu Gly Leu	Glu Lys Met His	Ser Ile Thr Gly Asn
	260	265	270
Arg Gly Ser	Gln Leu Ala Val	Gln Leu Gln Asp	Trp Asp Gly Asn Ala
	275	280	285

Lys Leu Leu Gln Phe Pro Ile His Leu Gly Gly Glu Asp Thr Ala Tyr
 290 295 300
 Ser Leu Gln Leu Thr Glu Pro Thr Ala Asn Glu Leu Gly Ala Thr Asn
 305 310 315 320
 Val Ser Pro Asn Gly Leu Ser Leu Pro Phe Ser Thr Trp Asp Gln Asp
 325 330 335
 His Asp Leu Arg Gly Asp Leu Asn Cys Ala Lys Ser Leu Ser Gly Gly
 340 345 350
 Trp Trp Phe Gly Thr Cys Ser His Ser Asn Leu Asn Gly Gln Tyr Phe
 355 360 365
 His Ser Ile Pro Arg Gln Arg Gln Glu Arg Lys Lys Gly Ile Phe Trp
 370 375 380
 Lys Thr Trp Lys Gly Arg Tyr Tyr Pro Leu Gln Ala Thr Thr Leu Leu
 385 390 395 400
 Ile Gln Pro Met Glu Ala Thr Ala Ala Ser
 405 410

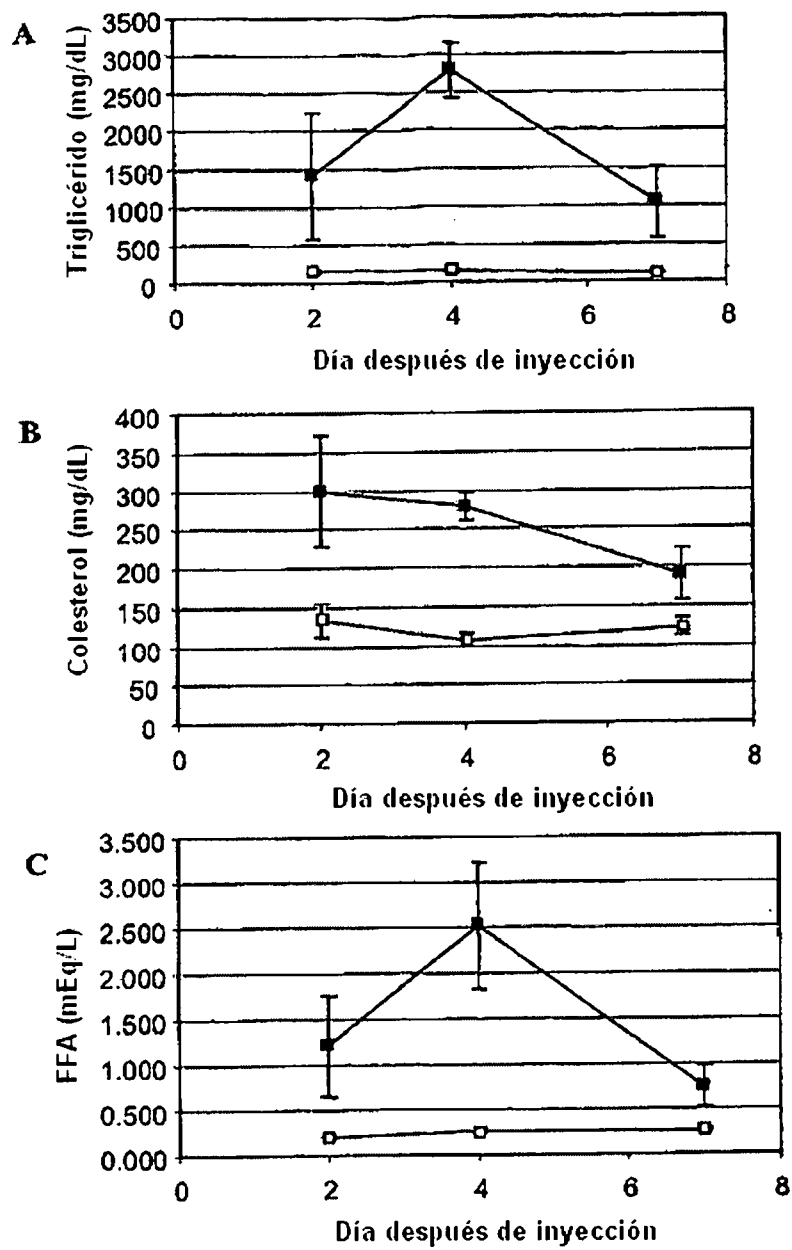


FIG. 1

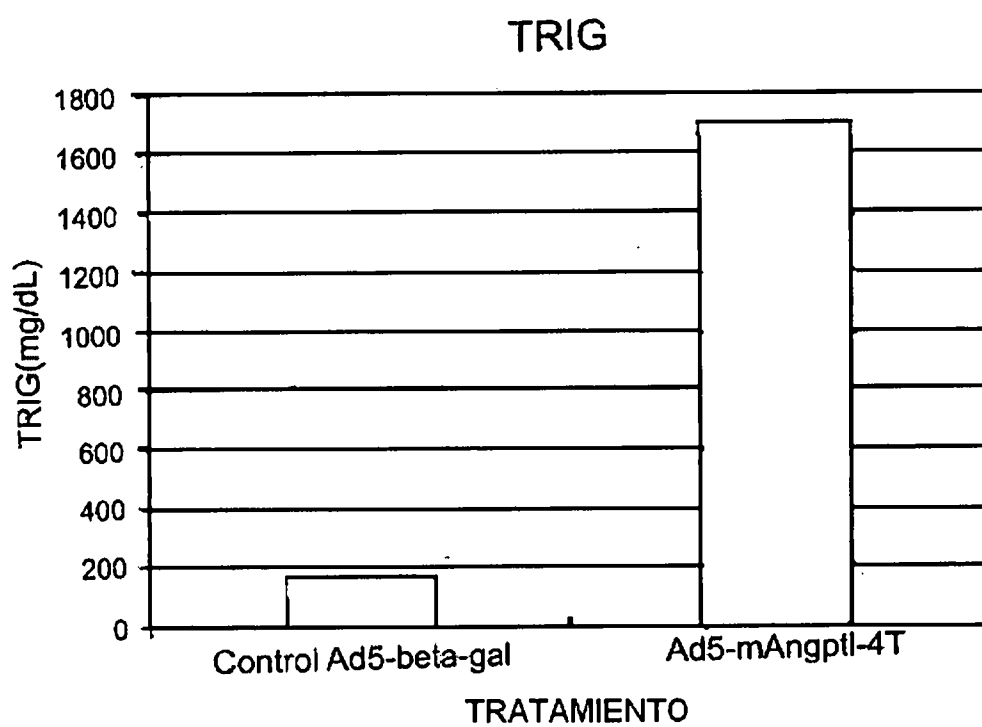


FIG. 2

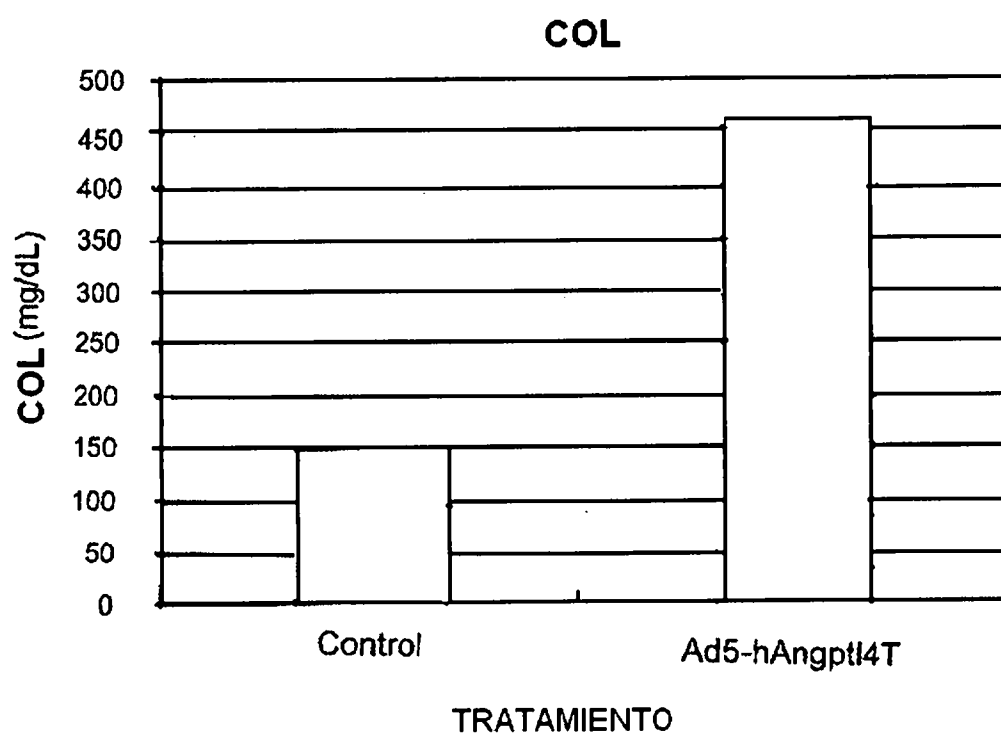


FIG. 3

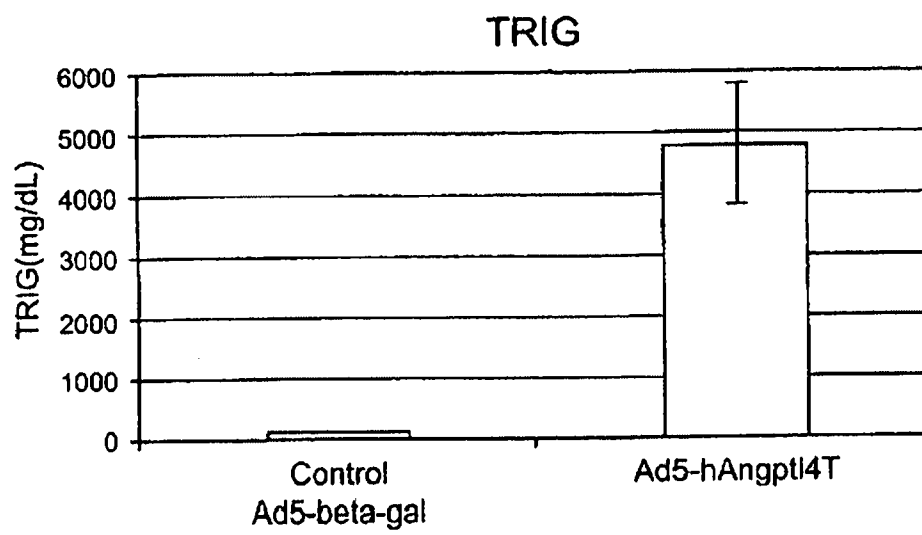


FIG. 4

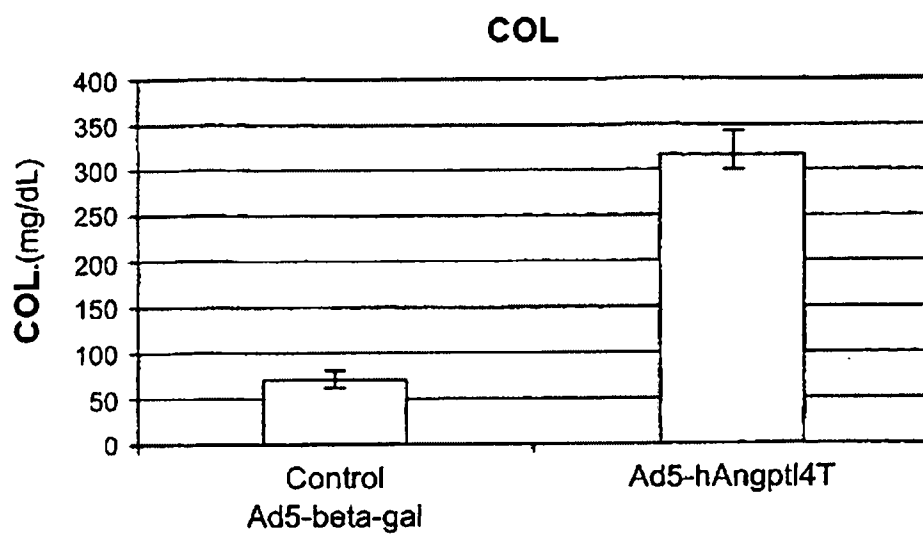


FIG. 5

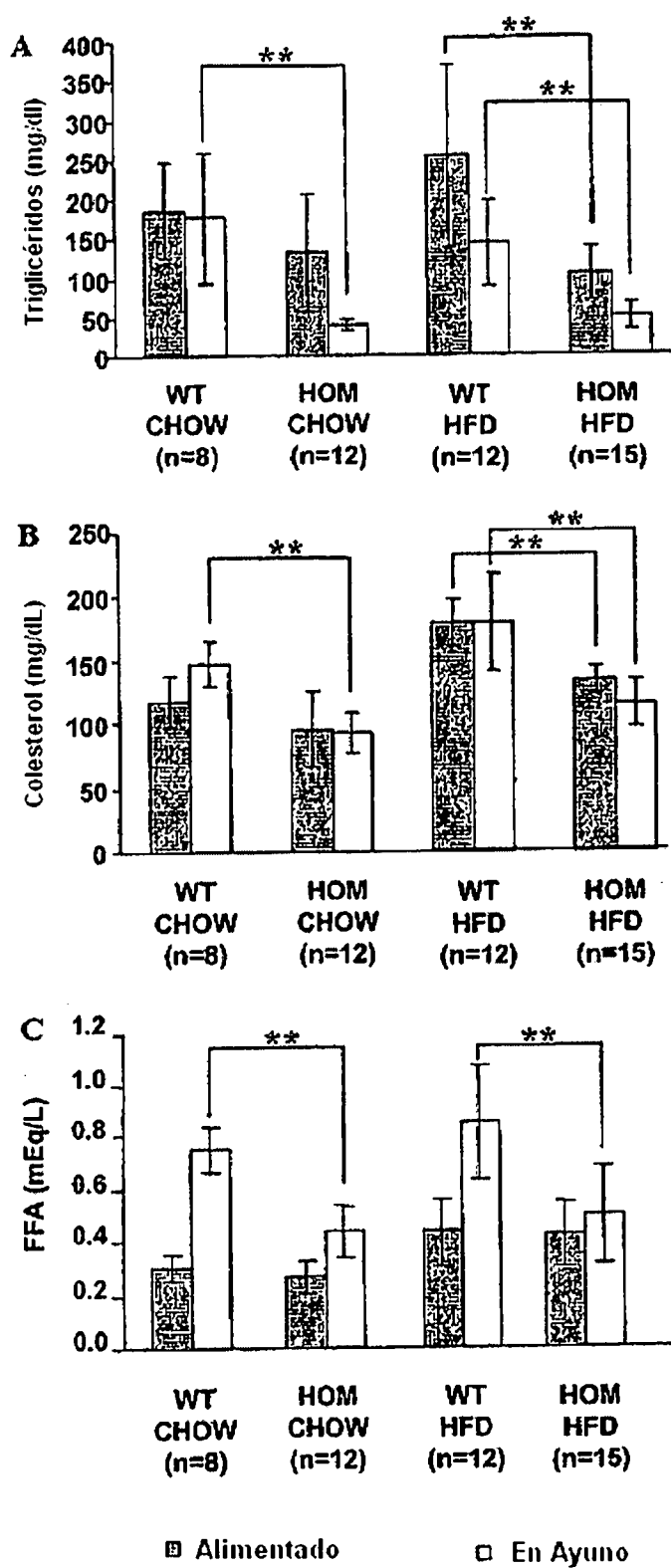


FIG. 6

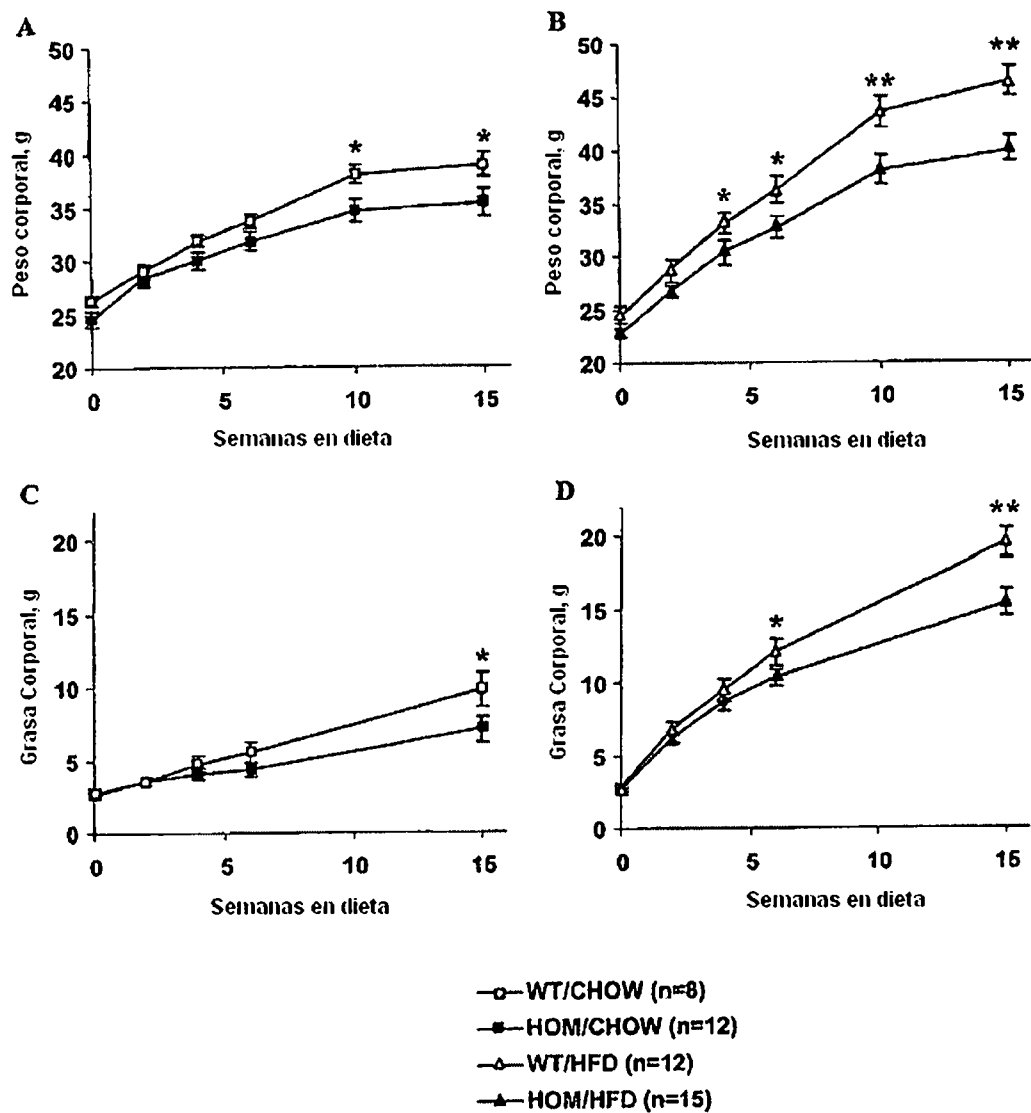


FIG. 7

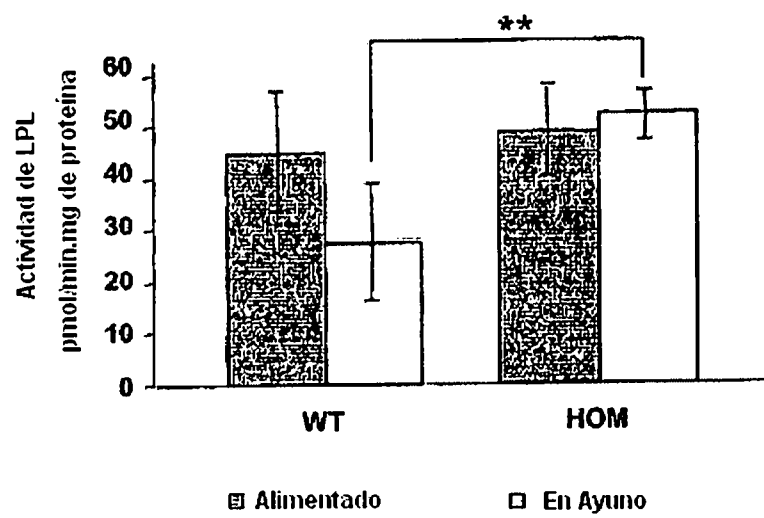
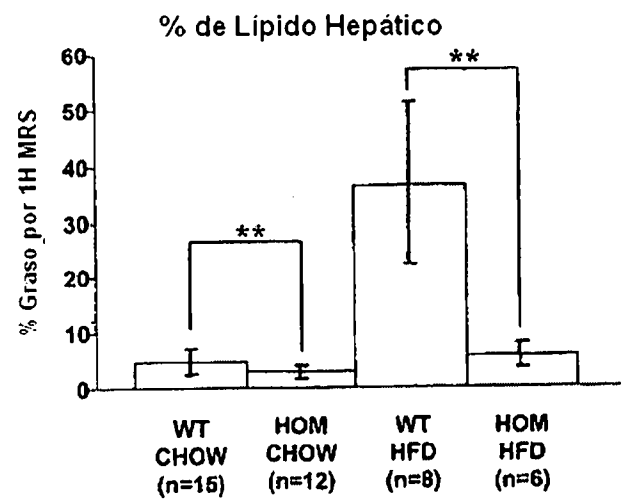


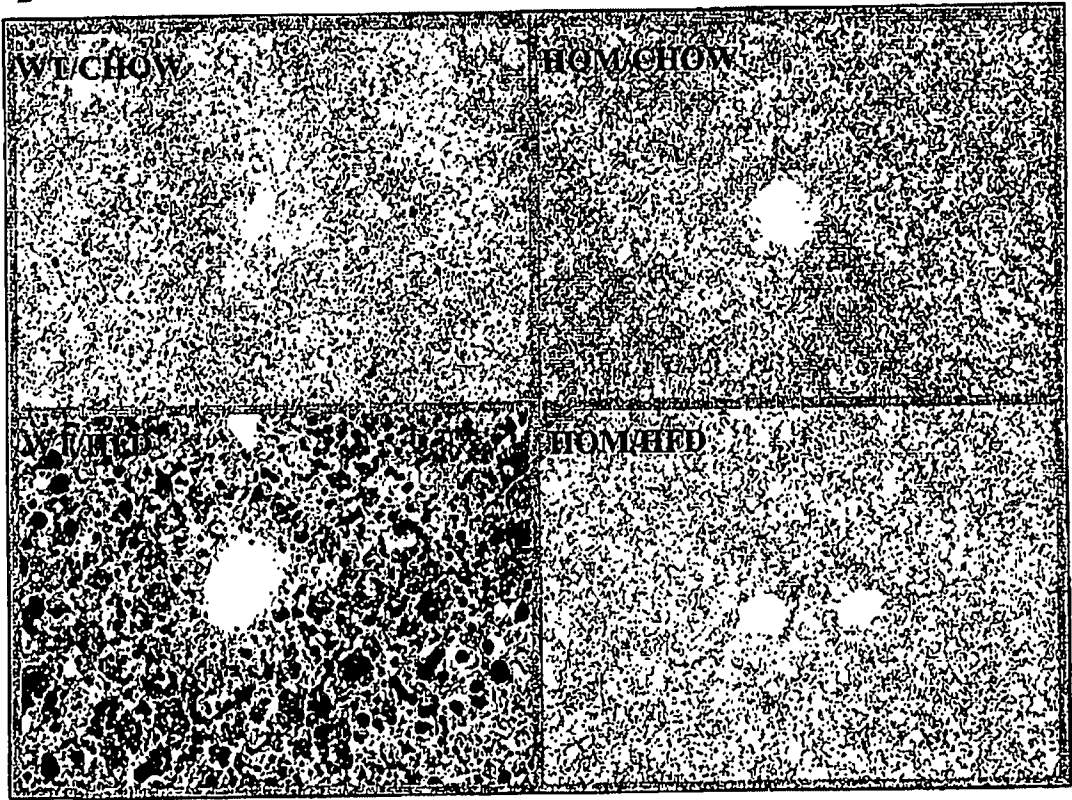
FIG. 8

FIG. 9

A



B



Análisis de ¹H-MRI - IMCL

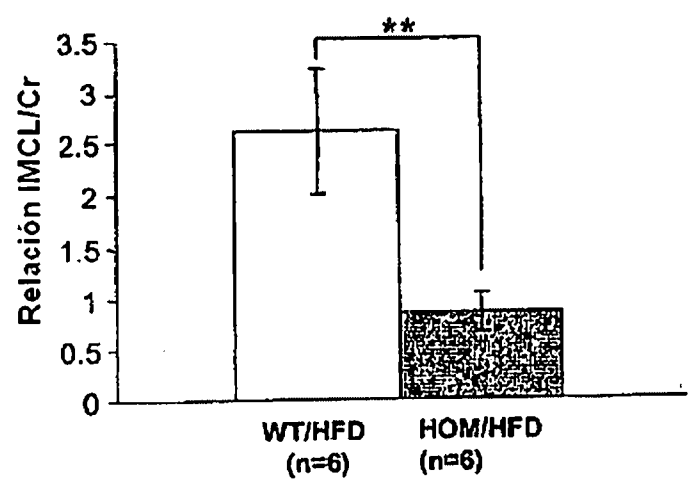


FIG. 10

10/43

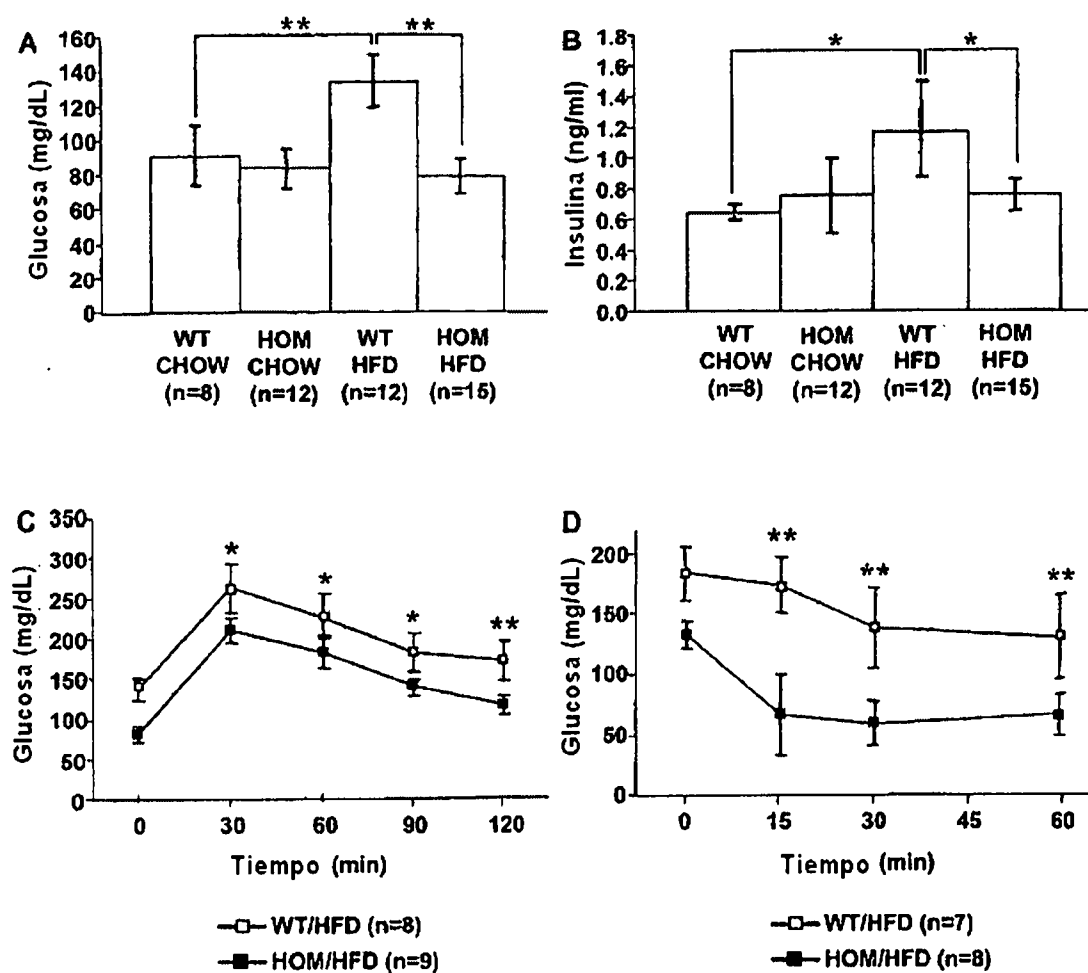


FIG. 11

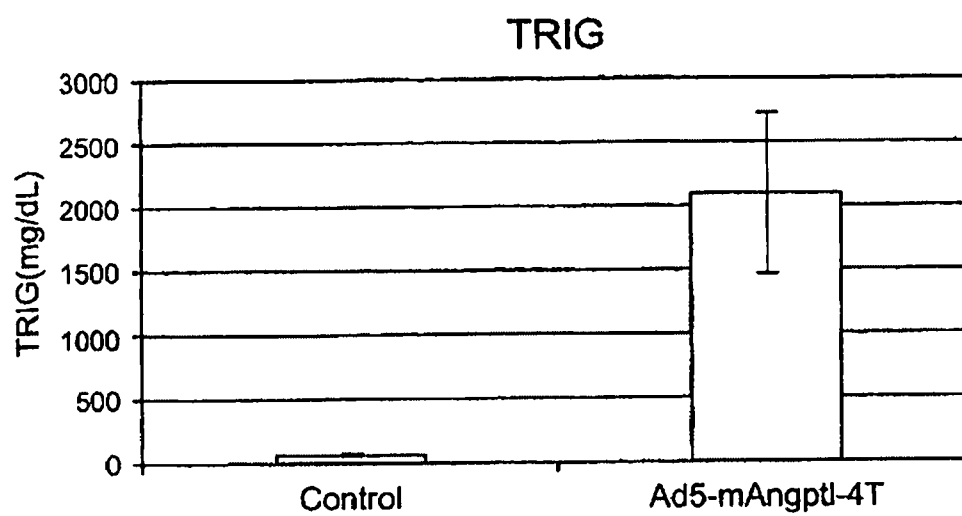


FIG. 12

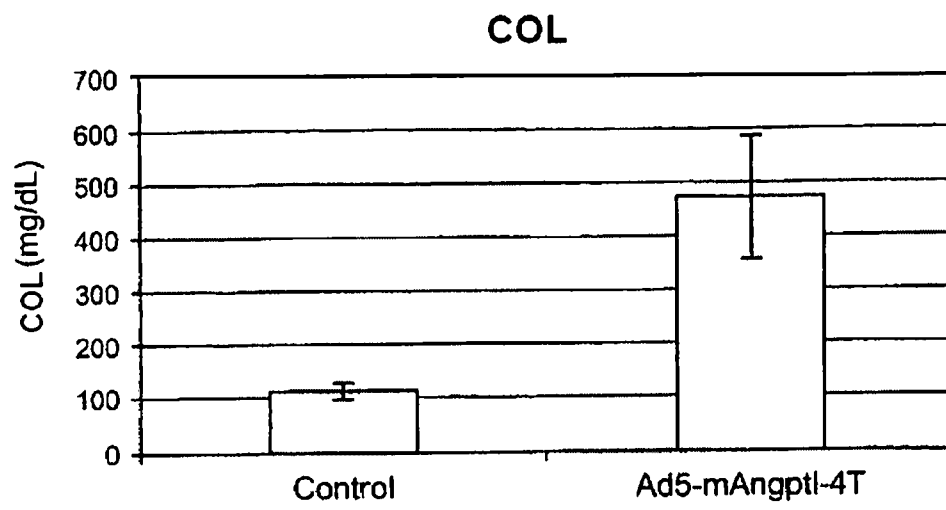


FIG. 13

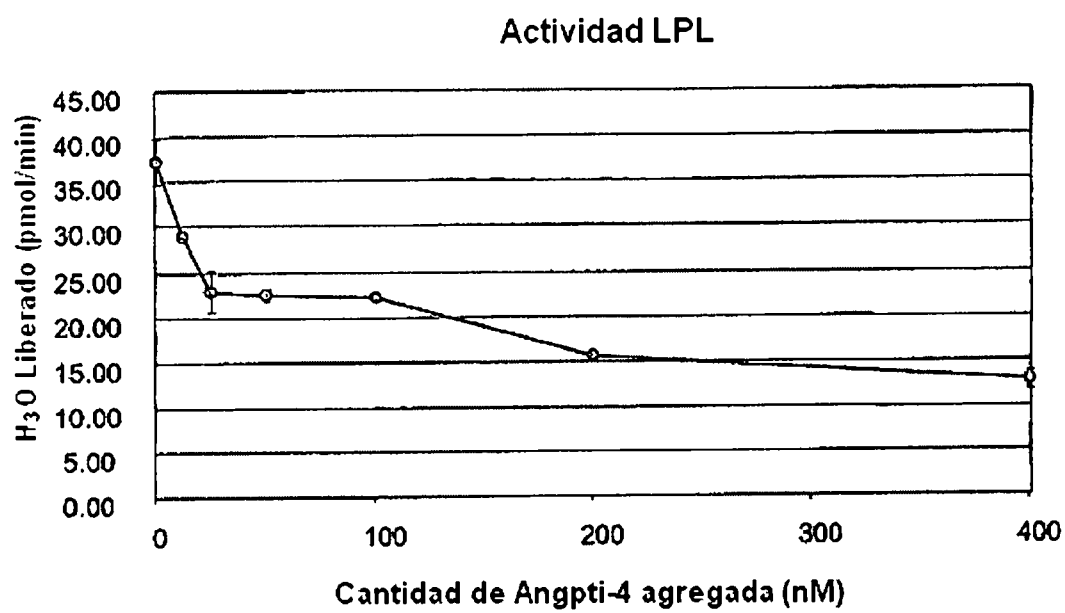


FIG. 14

14/43

Recuperación de la actividad de LPL por Anticuerpos monoclonales
Neutralizante de la inhibición por ANGPTL4 in vitro

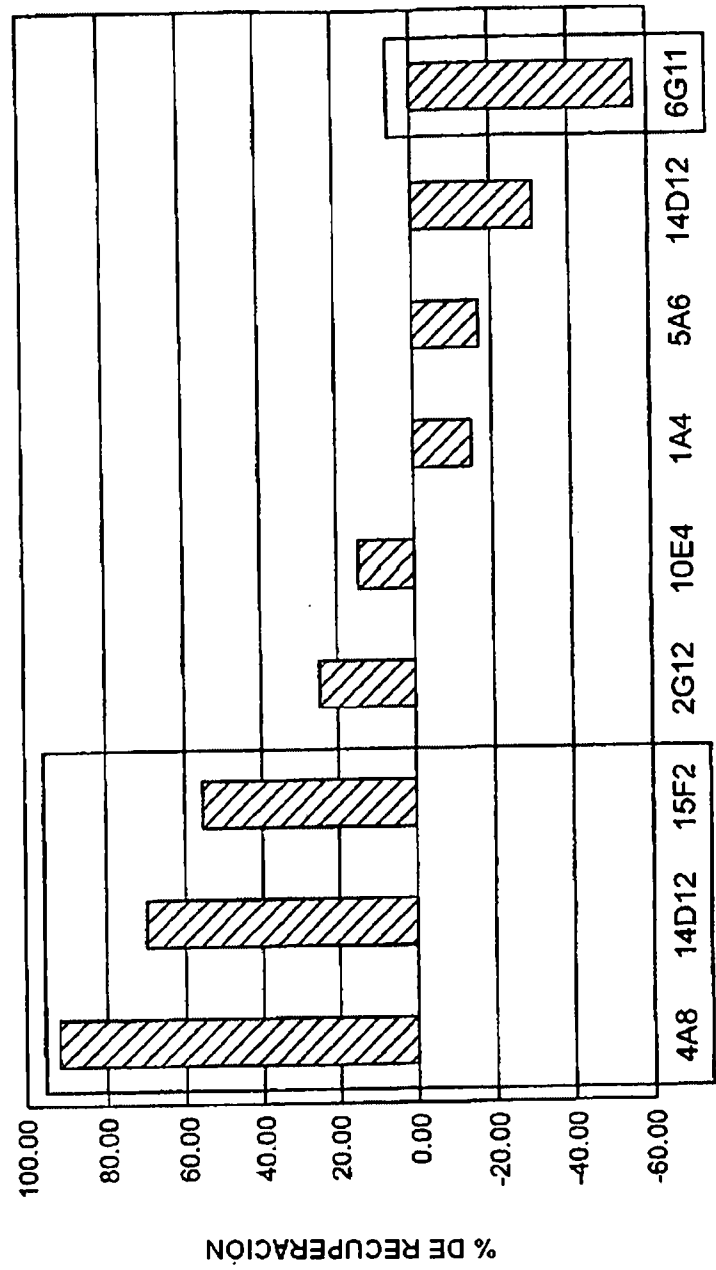


FIG. 15

206

Famílias de Epítopo

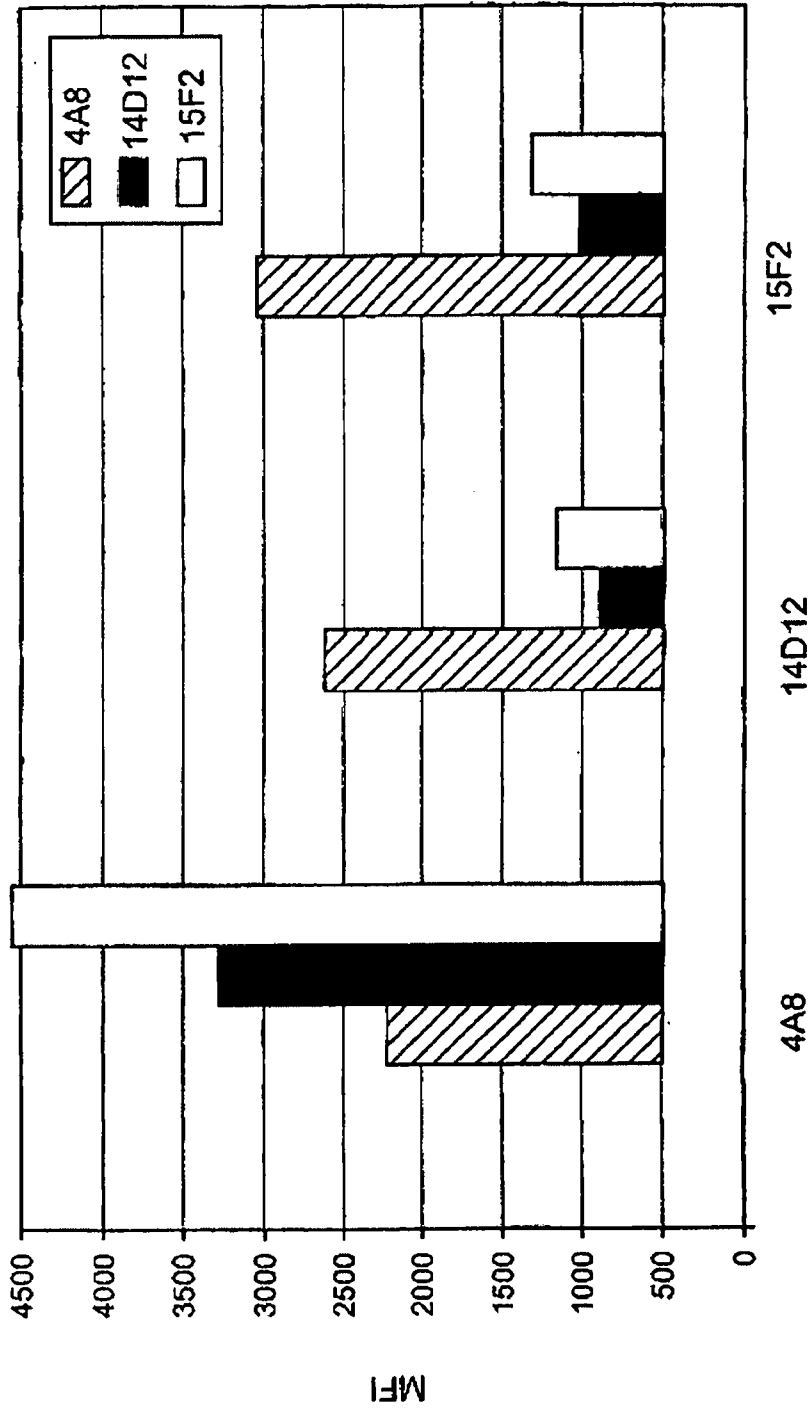
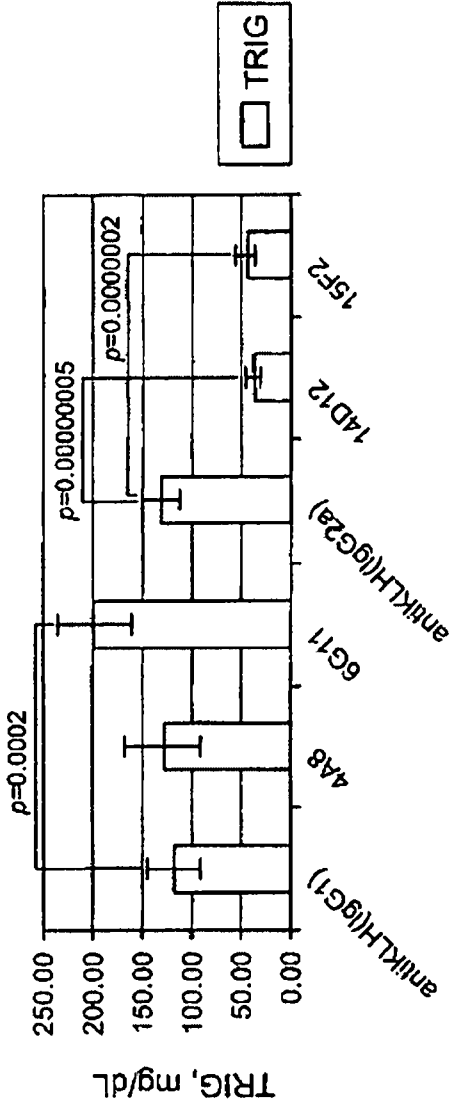


FIG. 16

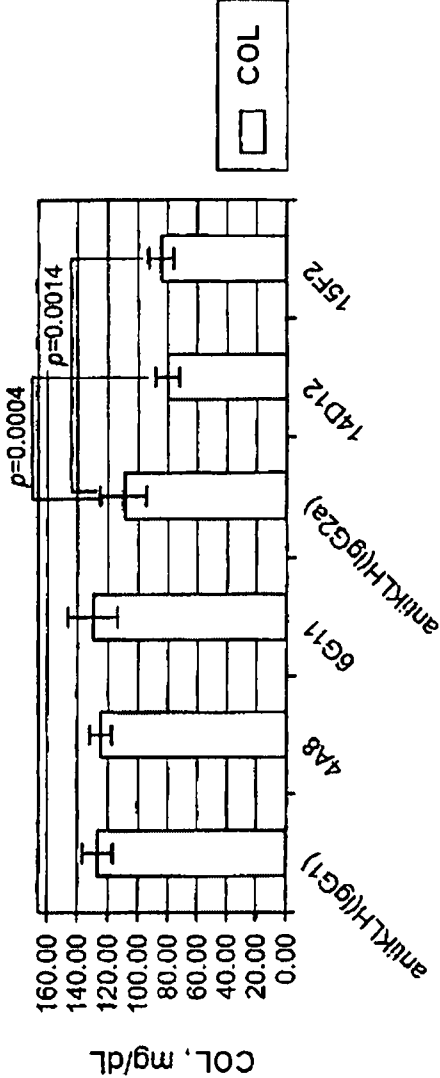
TRIGLICERIDO EN PLASMA EN AYUNO - RATONES / DIETA ESTANDAR



MAB anti ANGPTL4 de ratón	Triglicéridos en plasma	
	Estudio #1	Estudio #2
6G11	66.4% de Aumento	60.6% de Aumento
14D12	72.7% de Disminución	67.0% de Disminución
15F2	67.6% de Disminución	71.8% de Disminución

FIG. 17

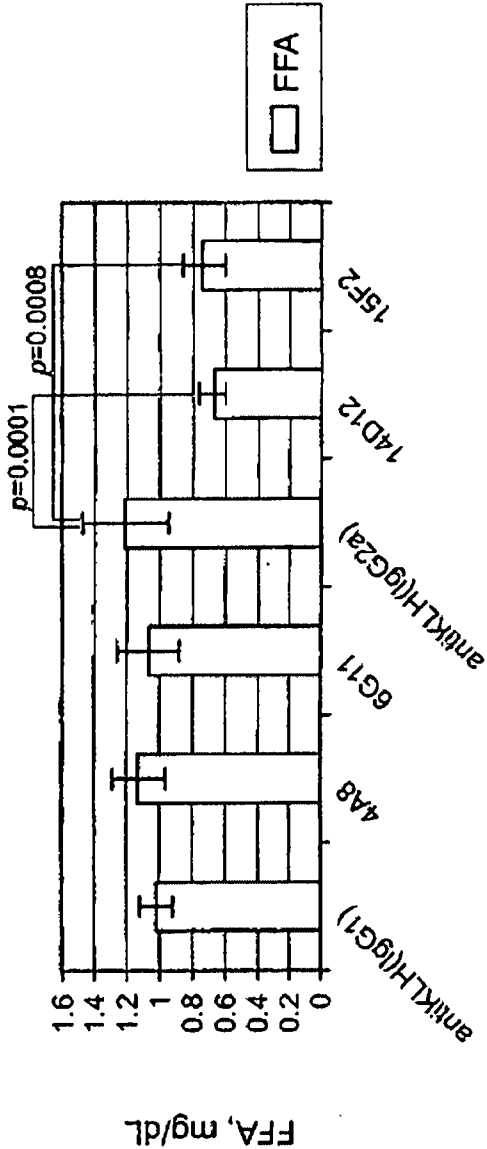
COLESTEROL EN PLASMA EN AYUNO - RATONES - DIETA ESTANDAR



MAB anti ANGPTL4 de Ratón	Colesterol en Plasma	
	Estudio #1	Estudio #2
14D12	27.1% de Disminución	21.3% de Disminución
15F2	22.8% de Disminución	28.0% de Disminución

FIG. 18

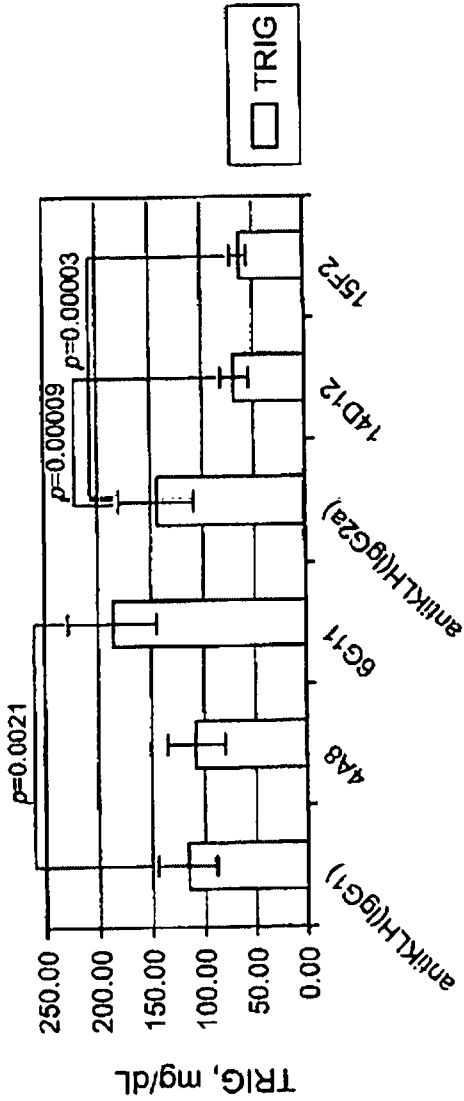
FFA EN PLASMA EN AYUNO - RATONES / DIETA ESTANDAR



MAb anti ANGPTL4 de ratón	FFA en plasma
	Estudio #1
14D12	44.3% de Disminución
15F2	39.3% de Disminución

FIG. 19

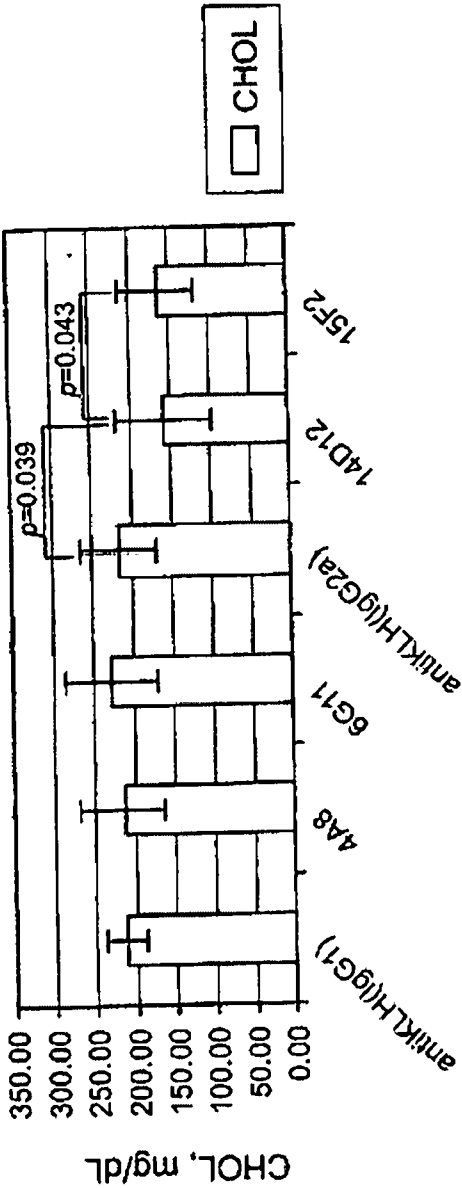
TRIGLICERIDO EN PLASMA EN AYUNO - RATONES - HFD



MAB anti ANGPTL4 de ratón	Triglicéridos en plasma
6G11	60.9% de Aumento
14D12	53.2% de Disminución
15F2	56.6% de Disminución

FIG. 20

COLESTEROL EN PLASMA EN AYUNO - RATONES / HFD

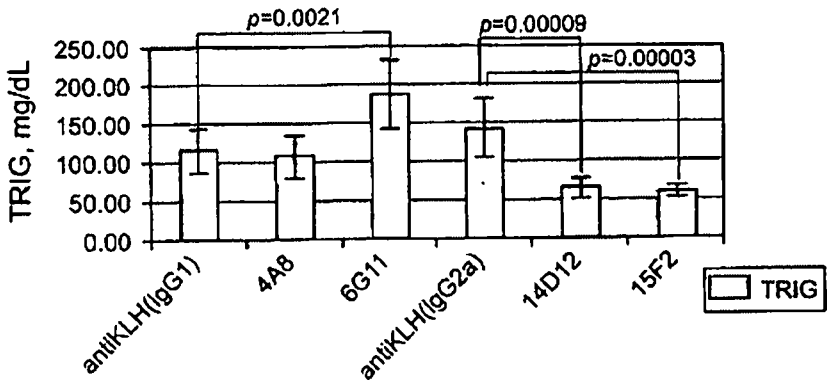


Anti ANGPTL4 de ratón	Colesterol en plasma
14D12	27.6% de Disminución
15F2	31.0% de Disminución

FIG. 21

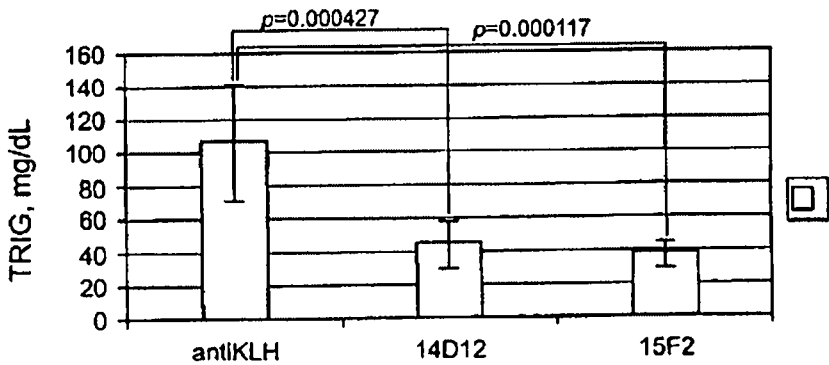
Ratones DIO: Triglicéridos en plasma después de inyección de mAb por 5 semanas

TRIG EN PLASMA EN AYUNO - ratones/HFD con una sola inyección



% de Aumento (antiKLH) - 6G11	60.94
% de Disminución (antiKLH) - 14D12	53.22
% de Disminución (antiKLH) - 15F2	56.61

TRIG EN PLASMA EN AYUNO - ratones/HFD con inyección de mAb por 5 semanas

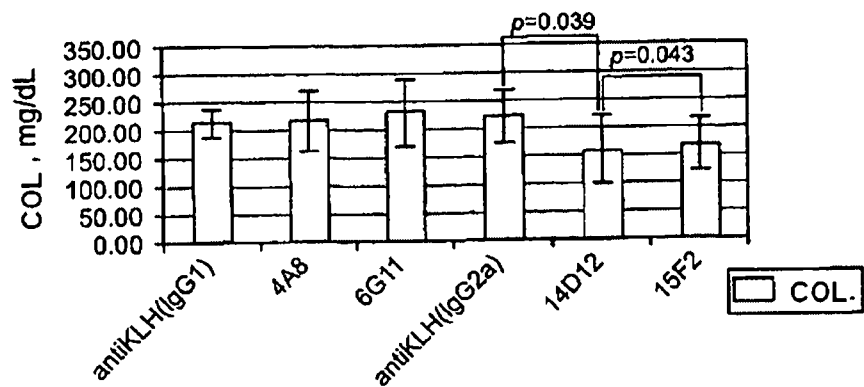


% de Disminución(antiKLH) - 14D12	59.35545
% de Disminución (antiKLH) - 15F2	64.45498

FIG. 22

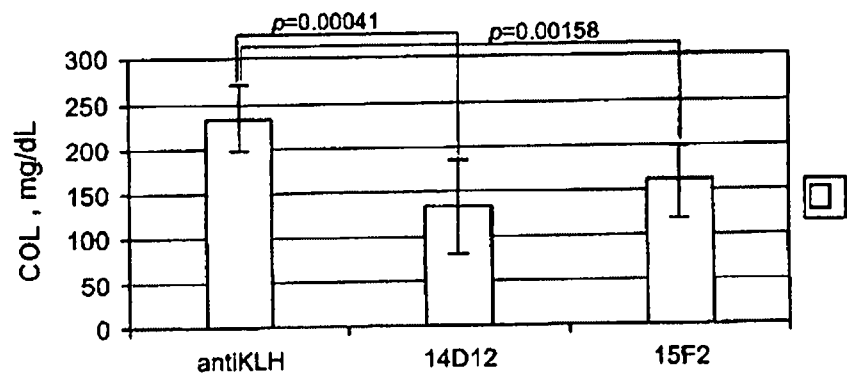
Ratones DIO: Colesterol en plasma después de inyección de mAb por 5 semanas

COL EN PLASMA EN AYUNO - ratones / HFD con una sola inyección



% de Disminución (antiKLH) - 14D12	27.58
% de Disminución (antiKLH) - 15F2	30.97

COL EN PLASMA EN AYUNO - ratones /HFD con inyección de mAb por 5 semanas



% de Disminución (antiKLH) - 14D12	44.20829
% de Disminución (antiKLH) - 15F2	32.73114

FIG. 23

KB EN PLASMA EN AYUNO- ratones/HFD con inyección de mAb por 5 semanas

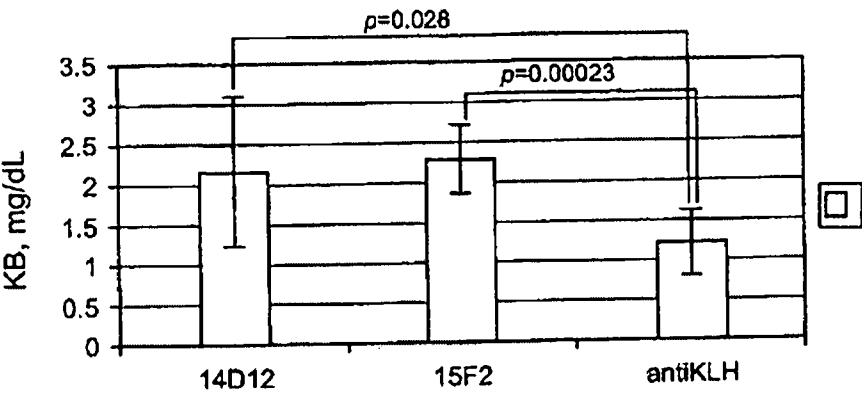
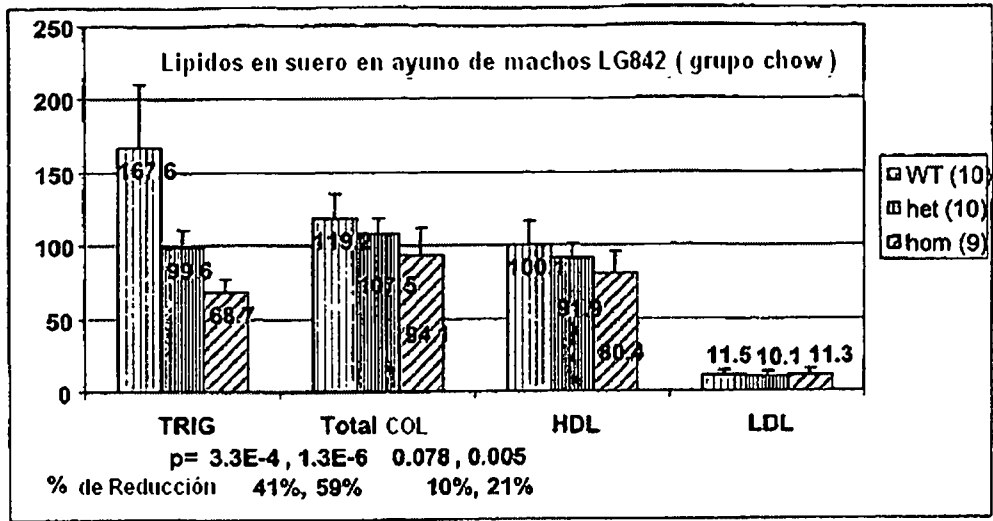


FIG. 24

A



B

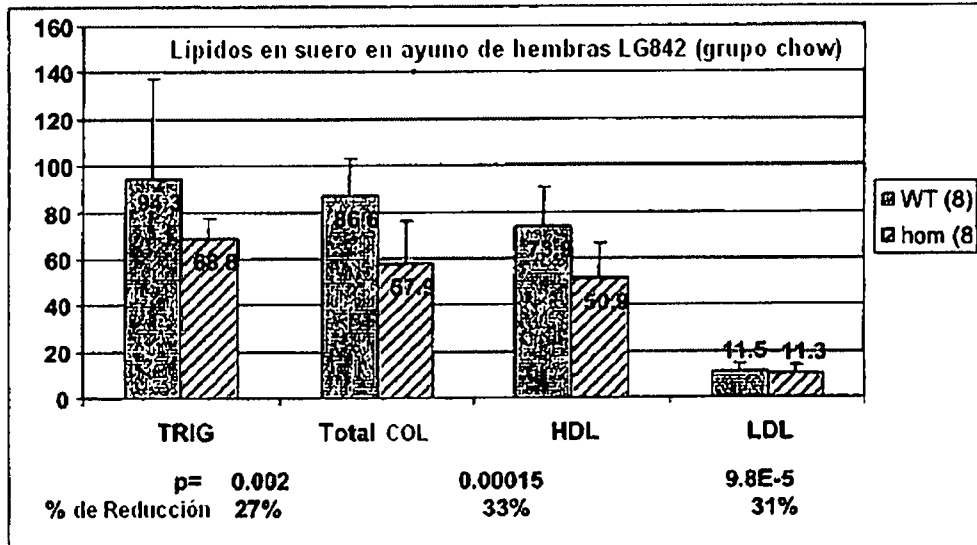


FIG. 25

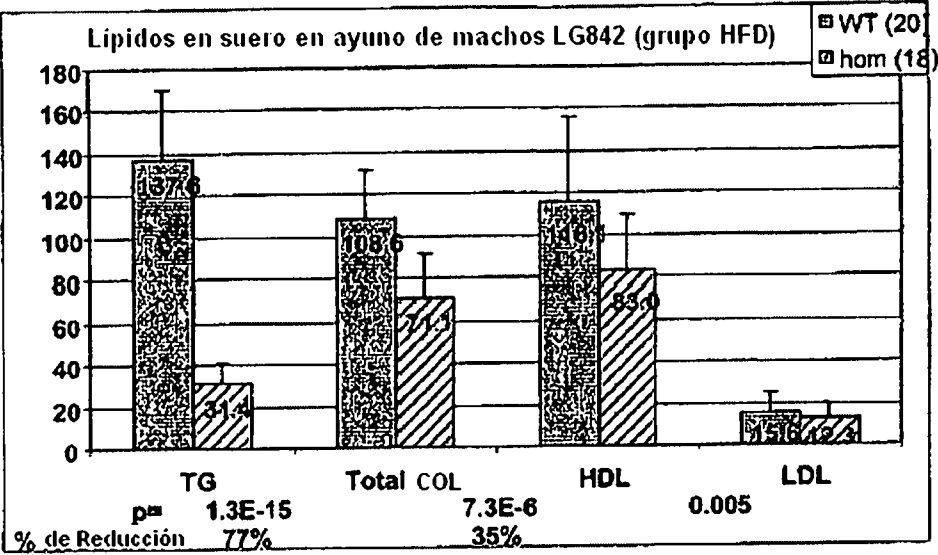


FIG. 26

217

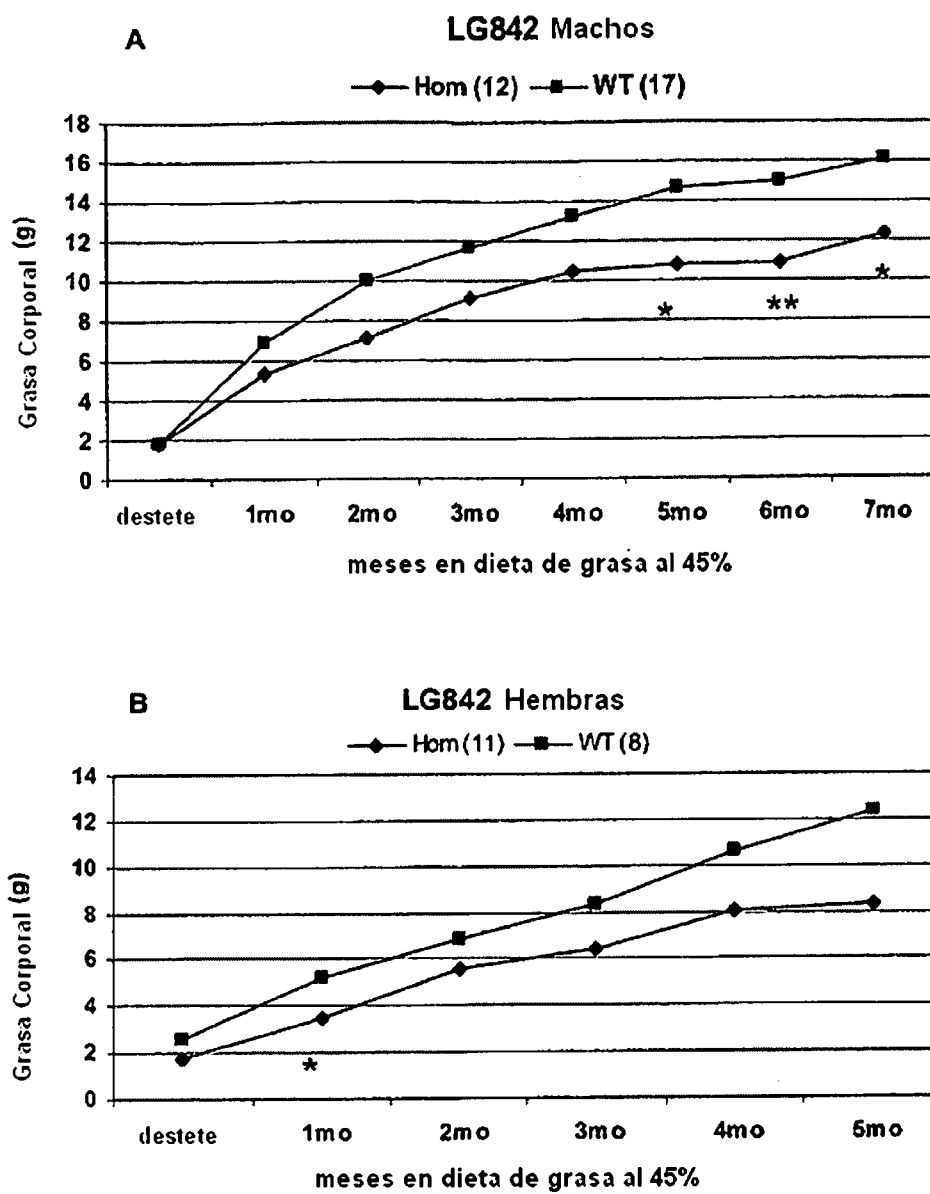


FIG. 27

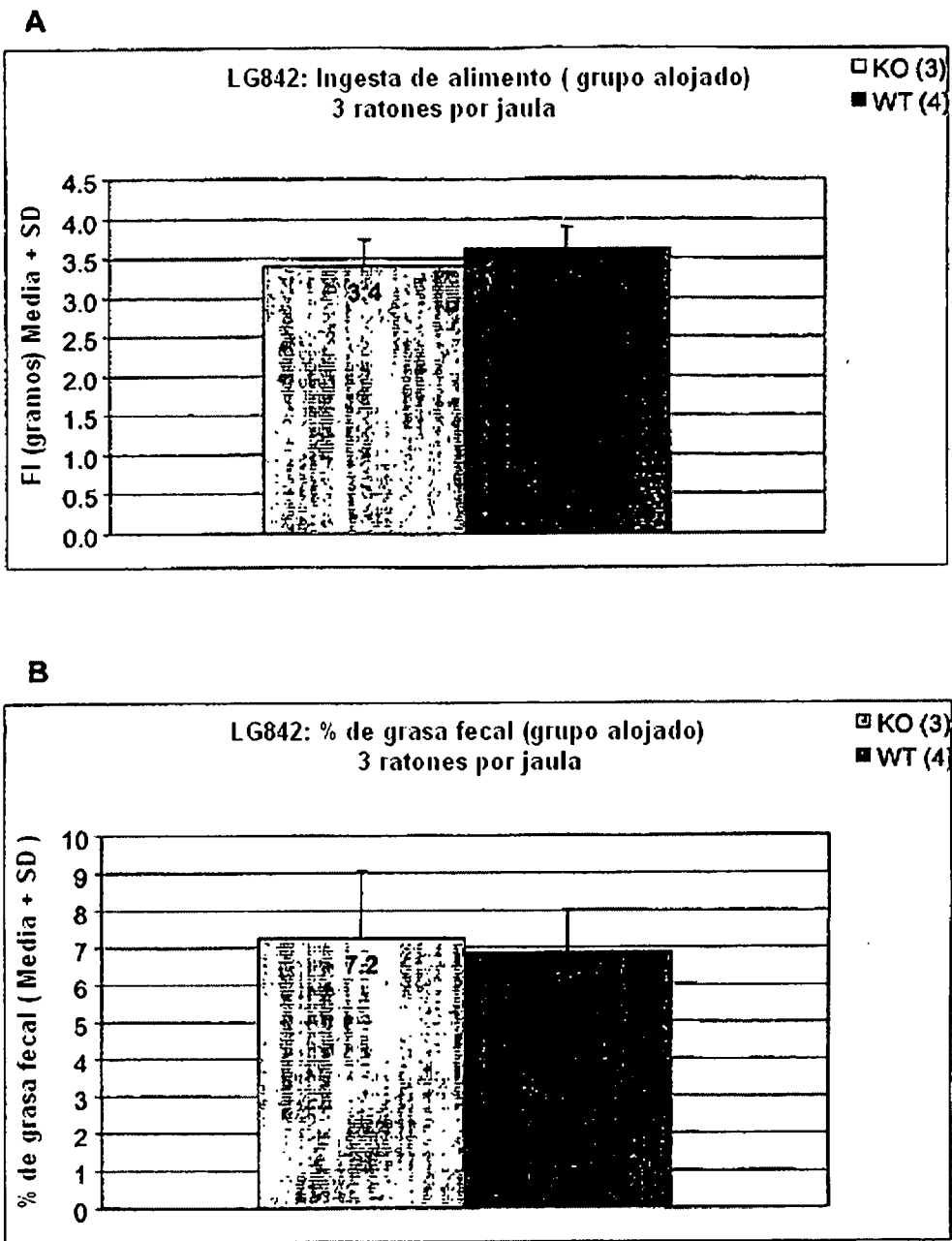


FIG. 28

Datos de liberación Interna				
	wt	het	hom	Total
Observado	516	1047	289	1852
Esperado	463.0	926.0	463.0	1852
Chi- Cua= 87.27 Significancia = 1.1208849E-19(hom/n)= 0.16 Tamaño de Camada = 8 Prom.				

FIG. 29

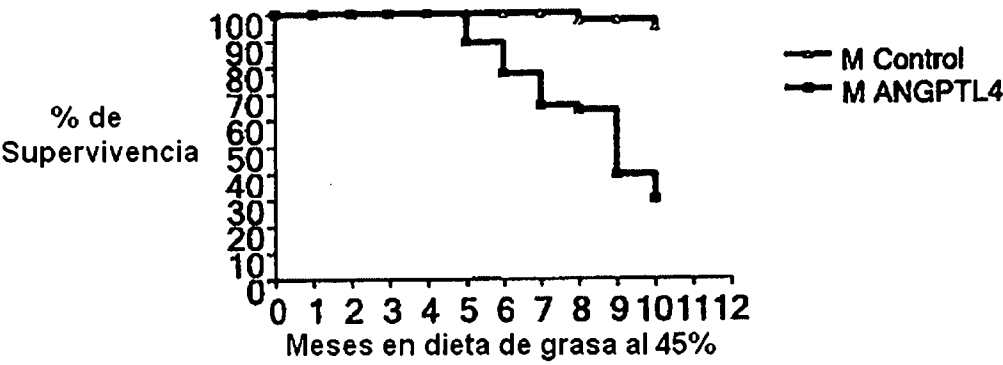


FIG. 30

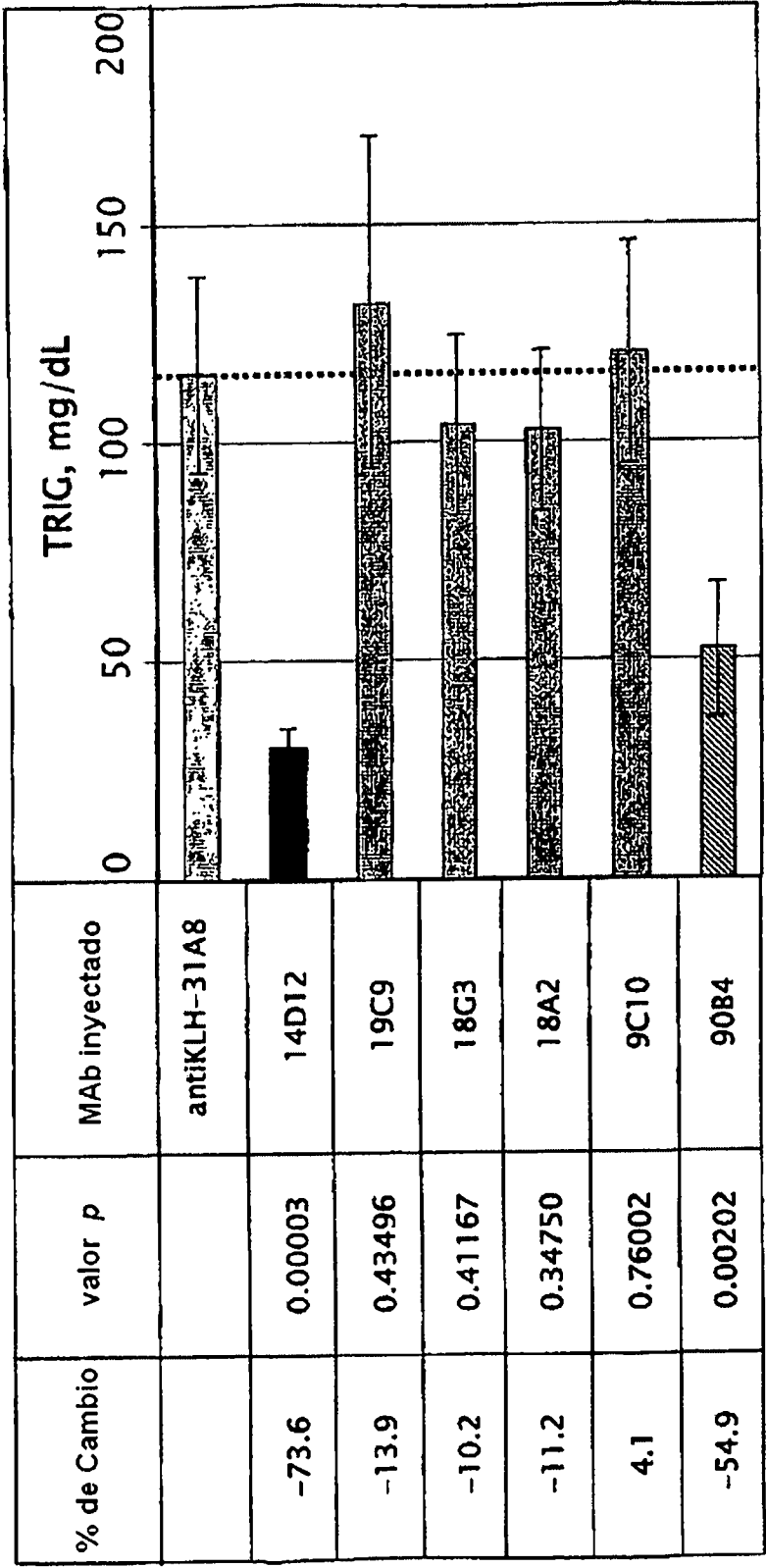


FIG. 31

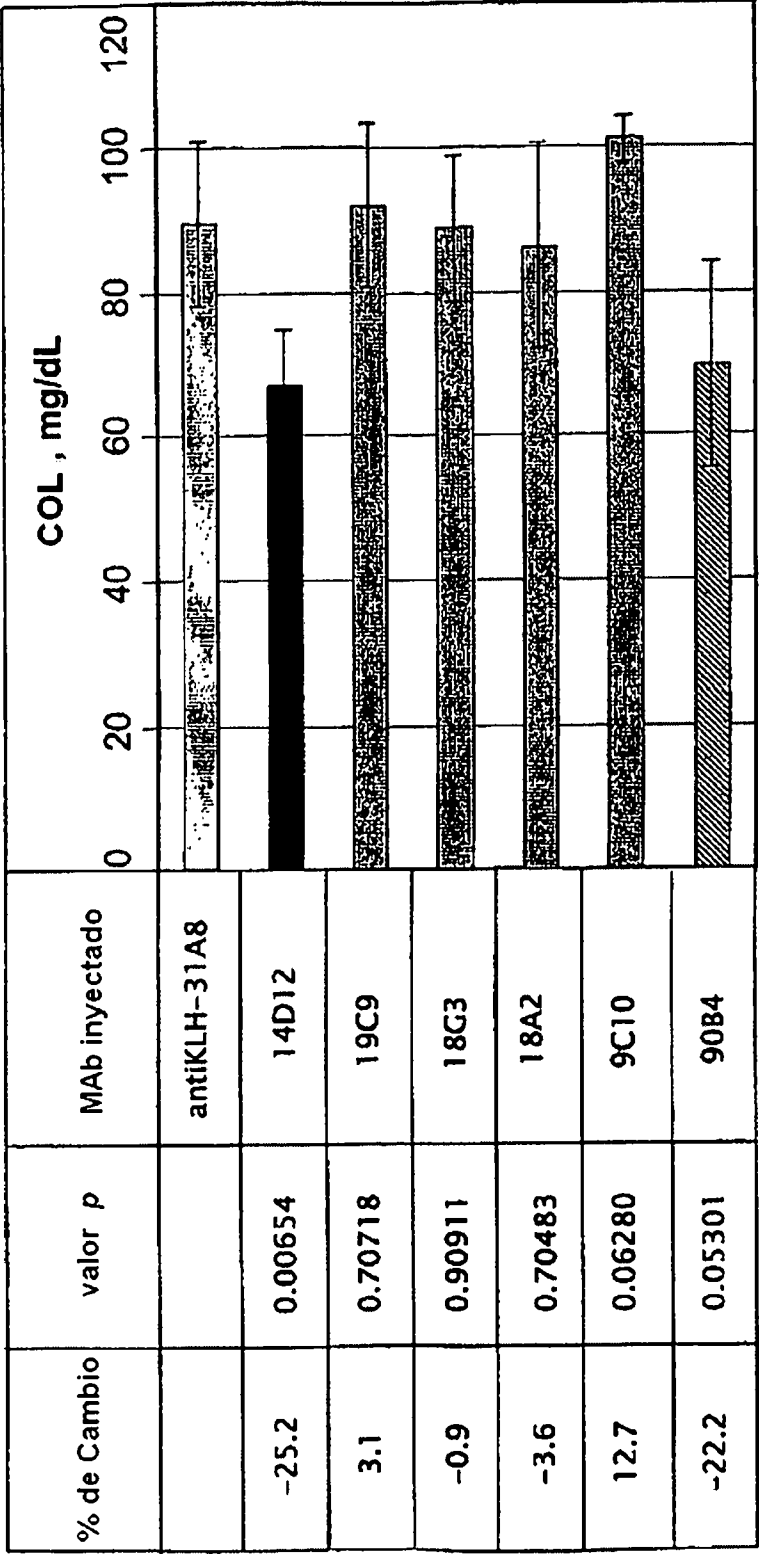


FIG. 32

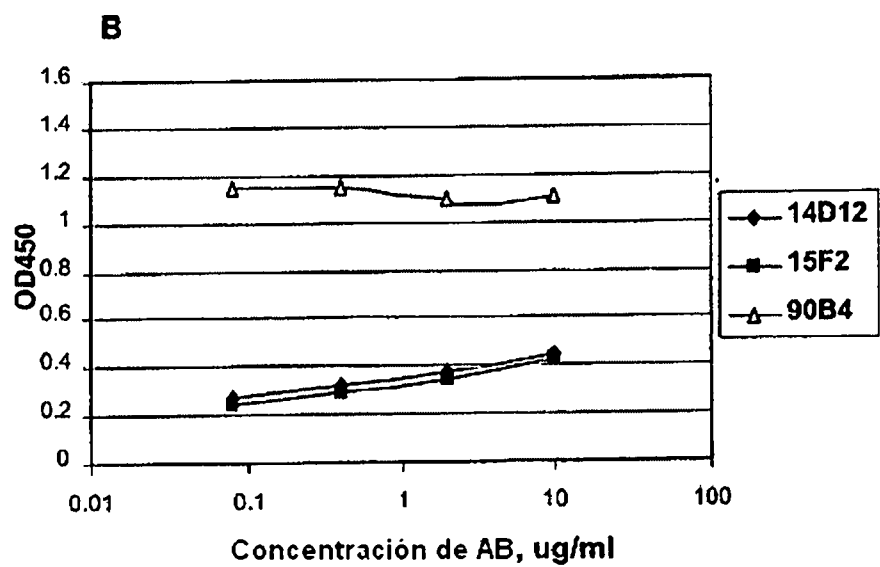
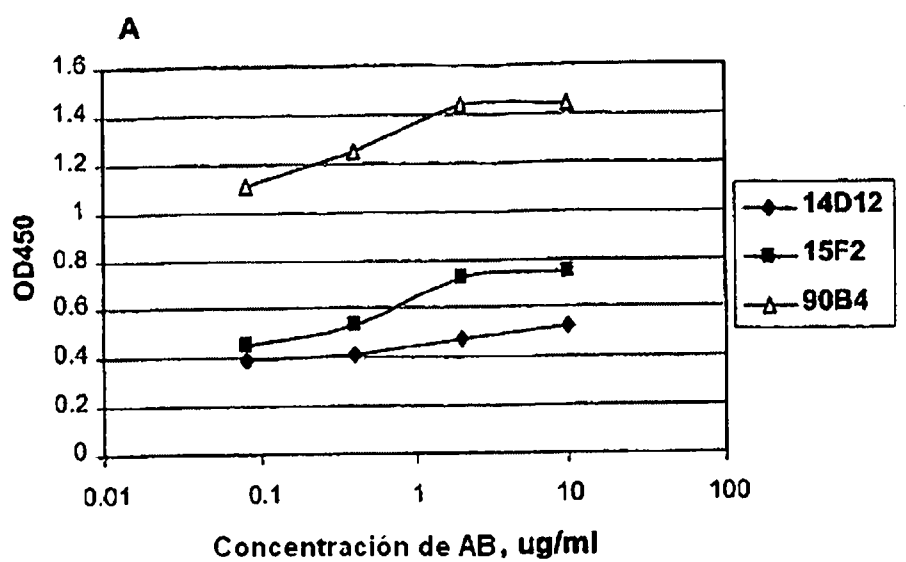


FIG. 33

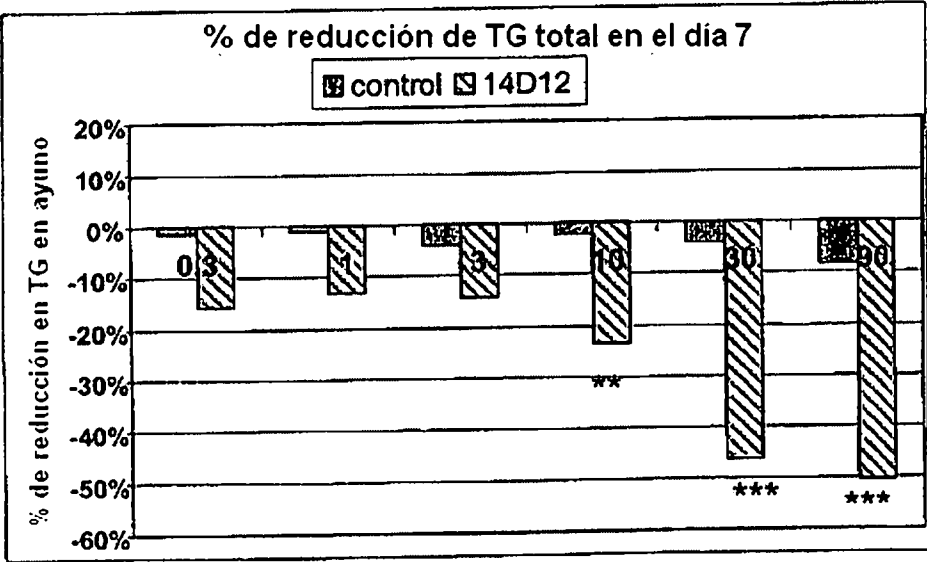
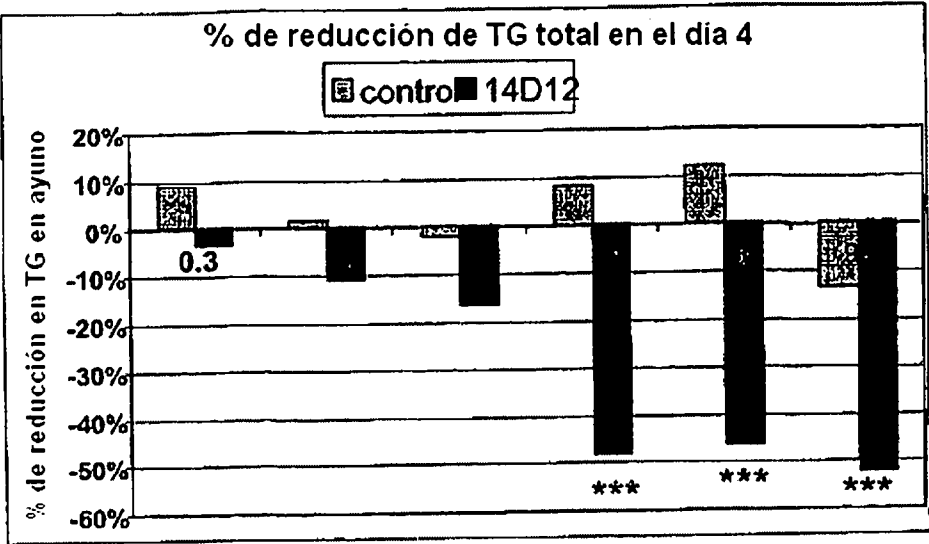


FIG. 34

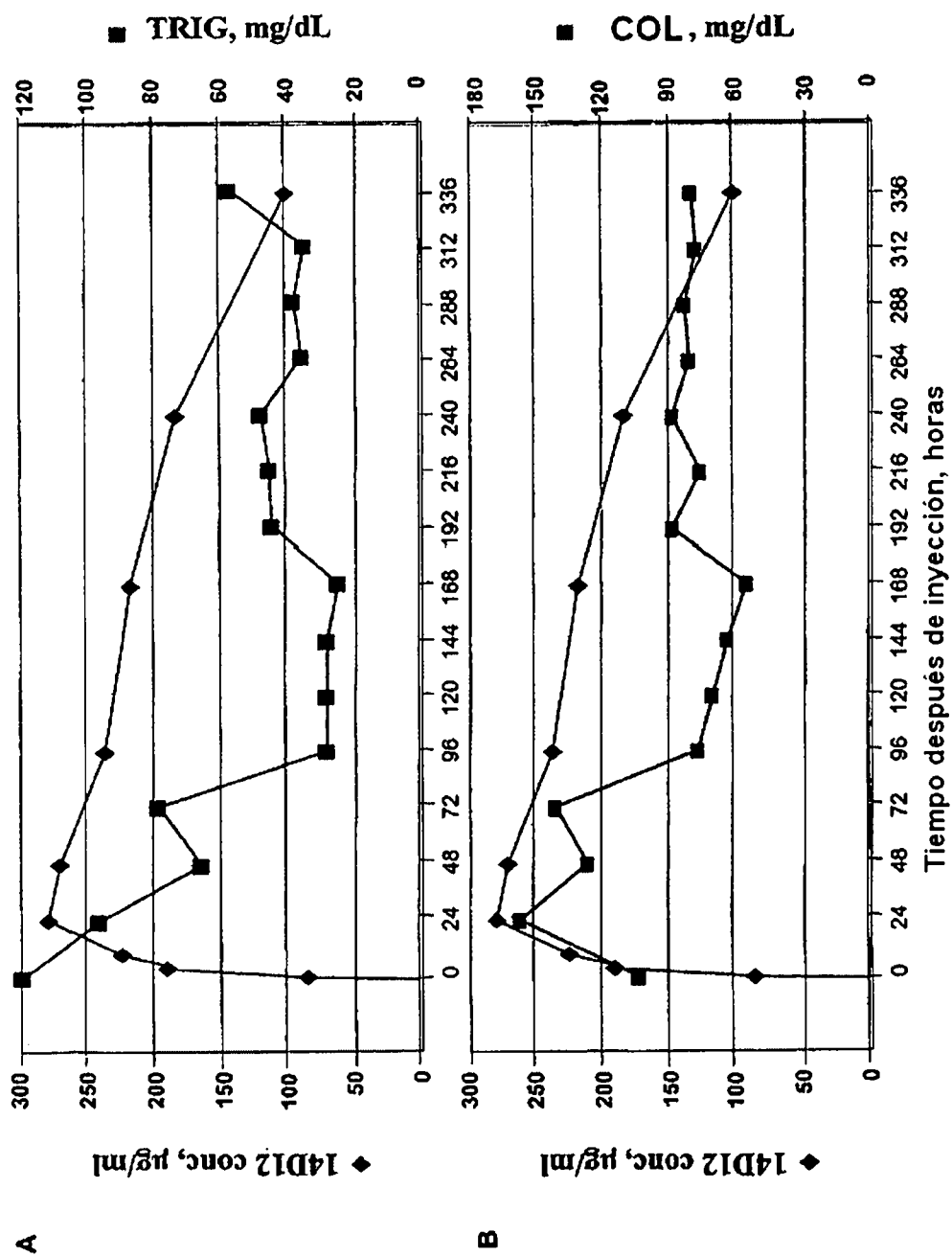


FIG. 35

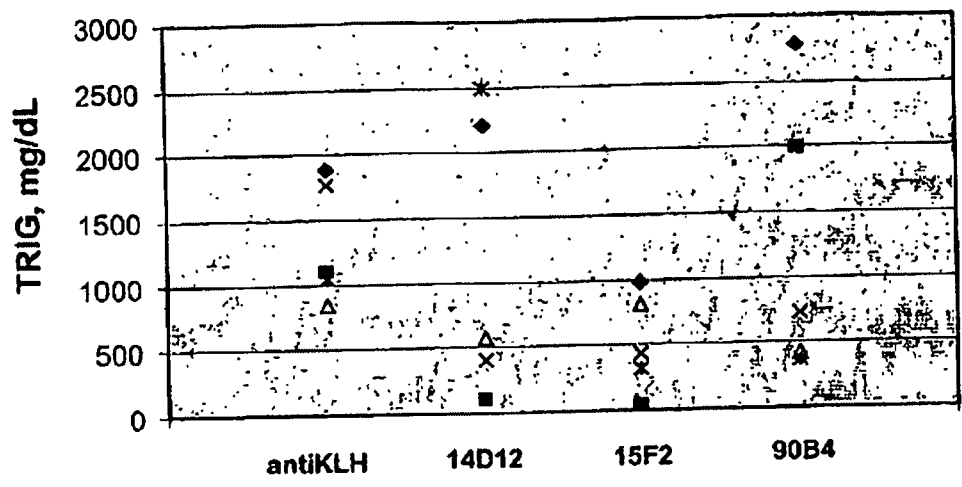


FIG. 36

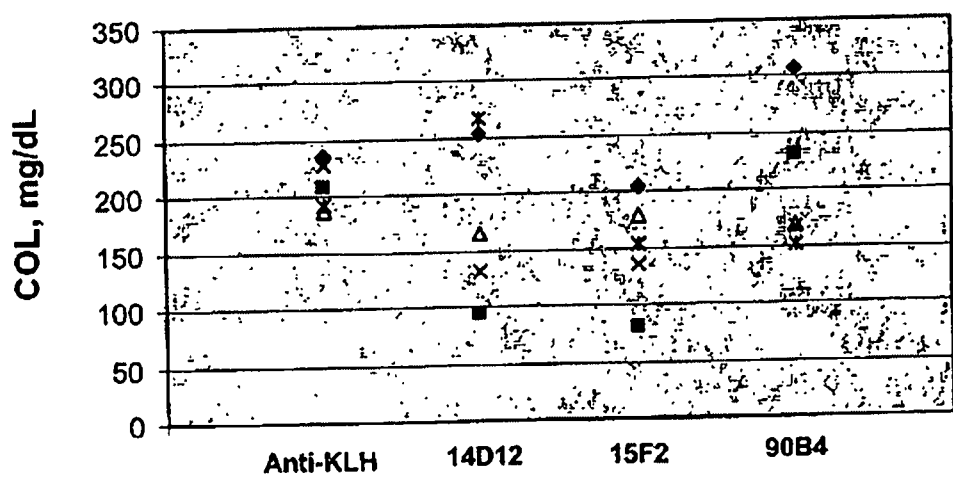


FIG. 37

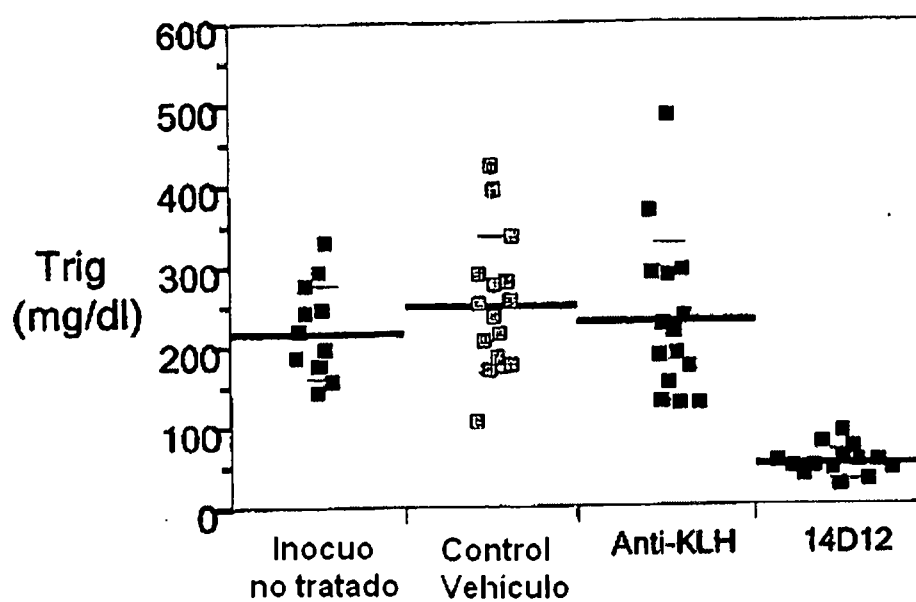


FIG. 38

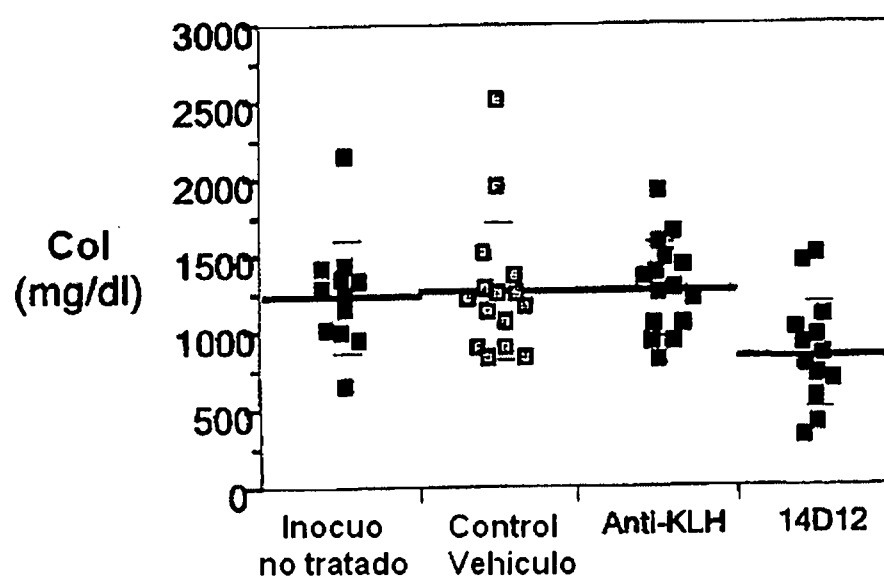


FIG. 39

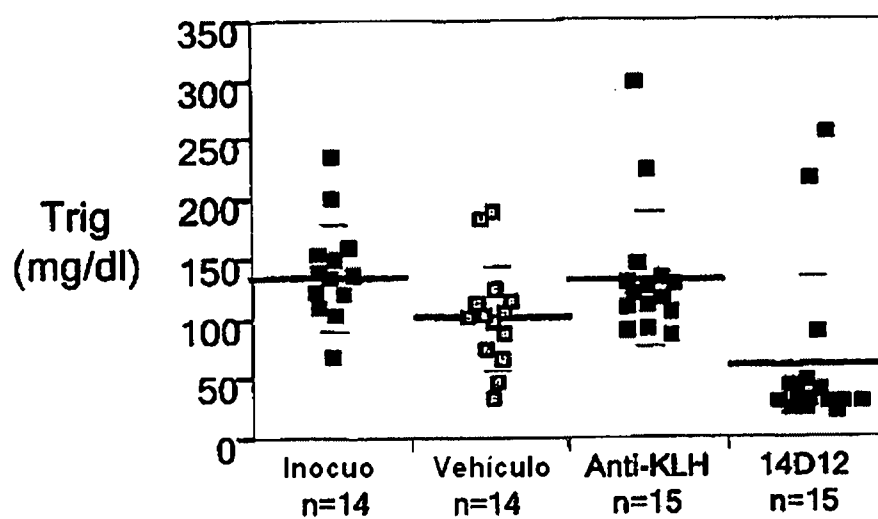


FIG. 40

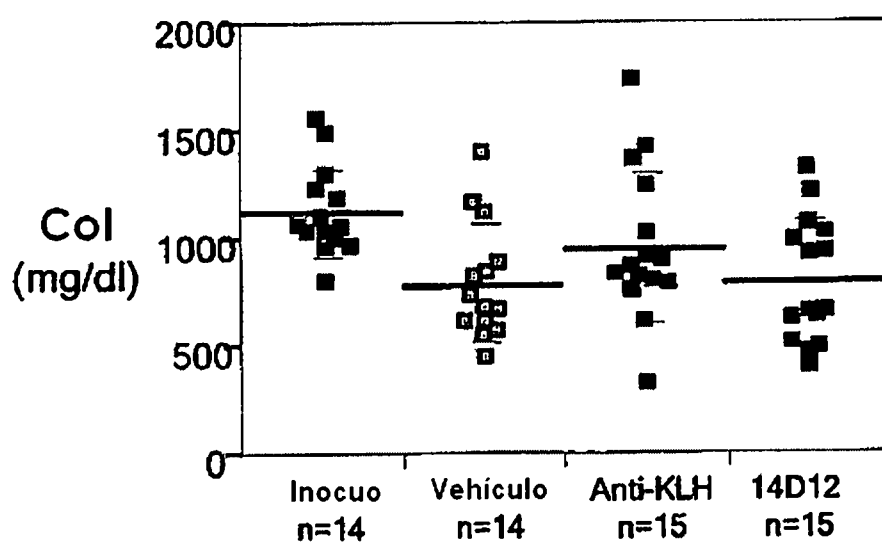


FIG. 41

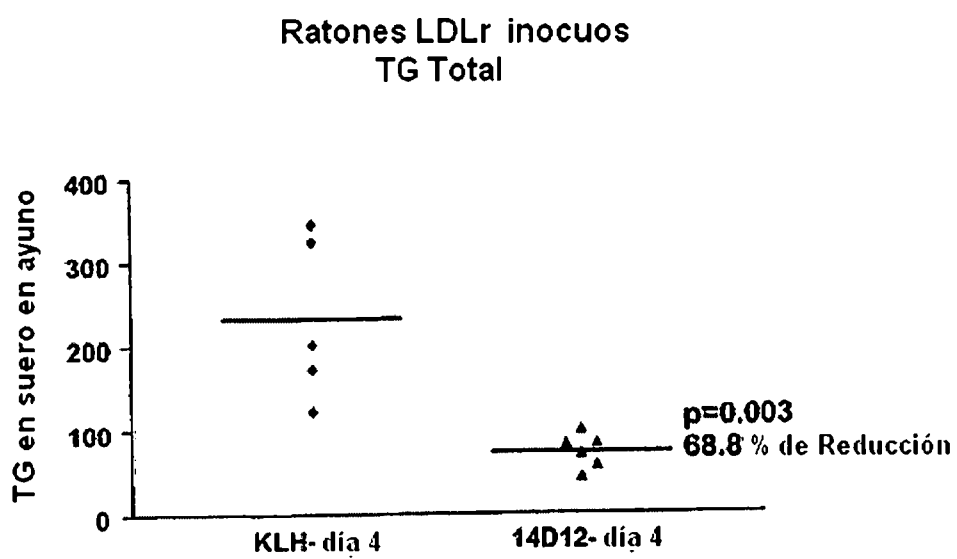


FIG. 42

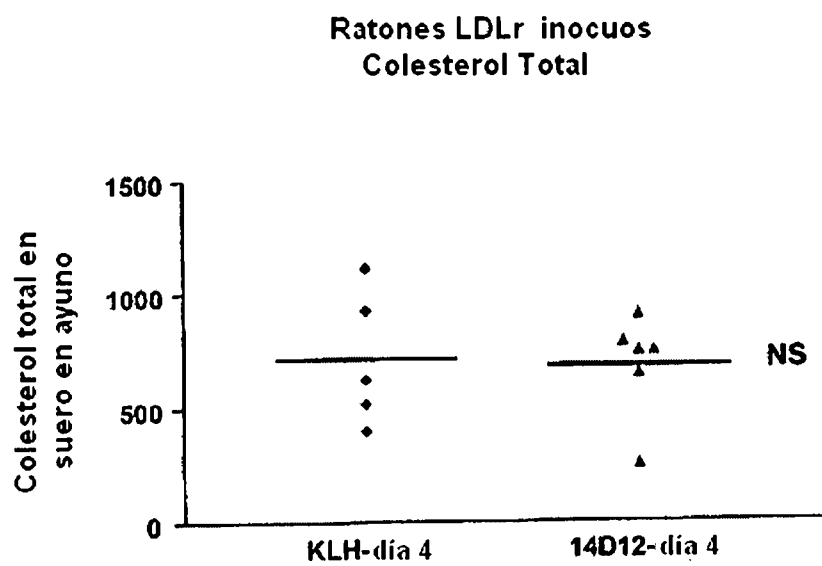


FIG. 43

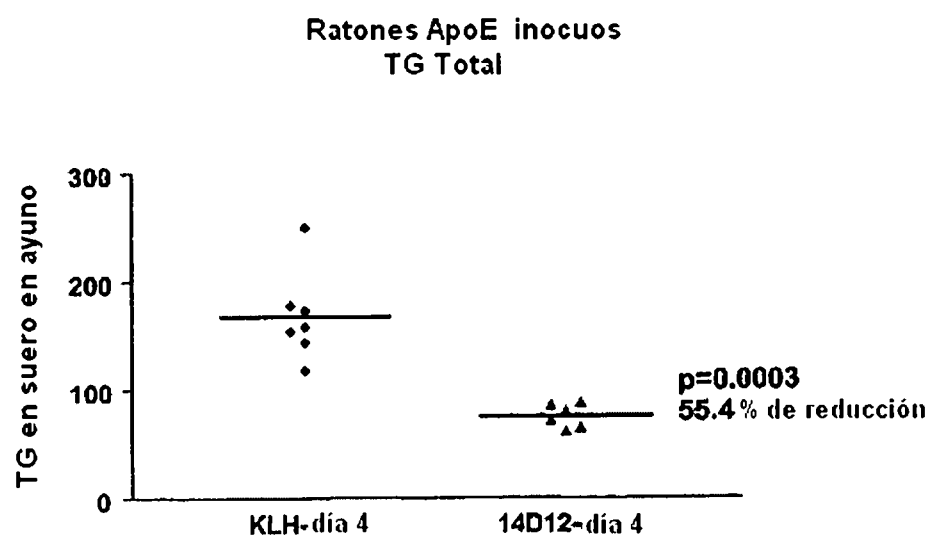


FIG. 44

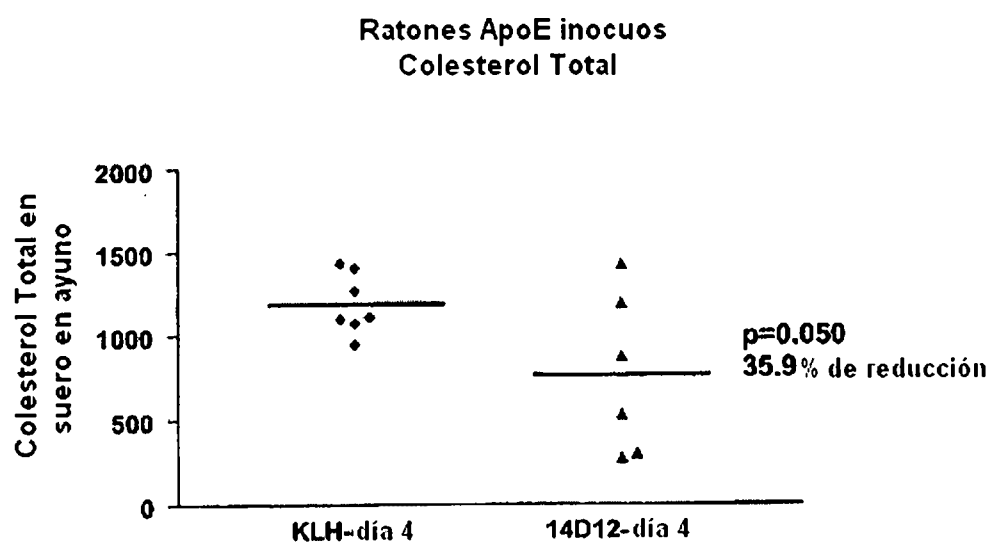


FIG. 45

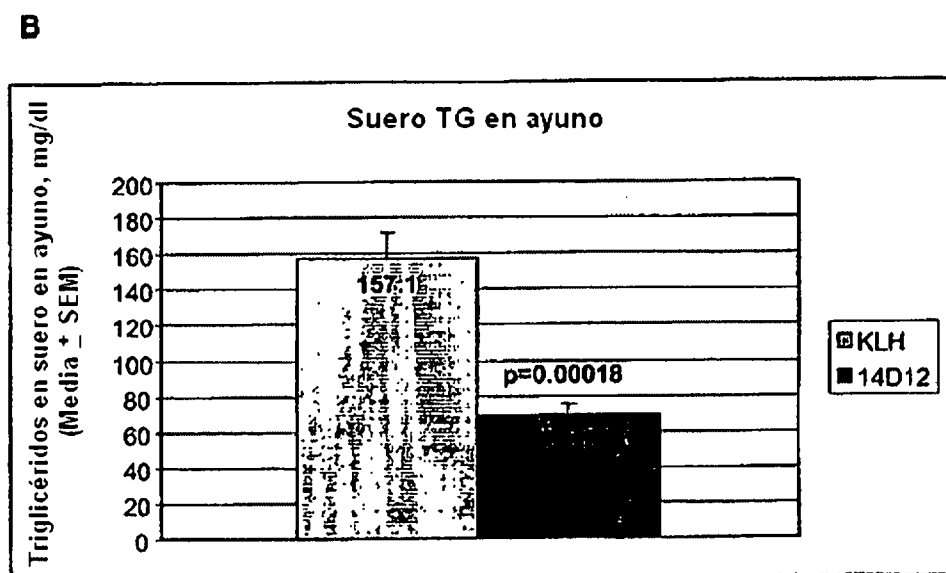
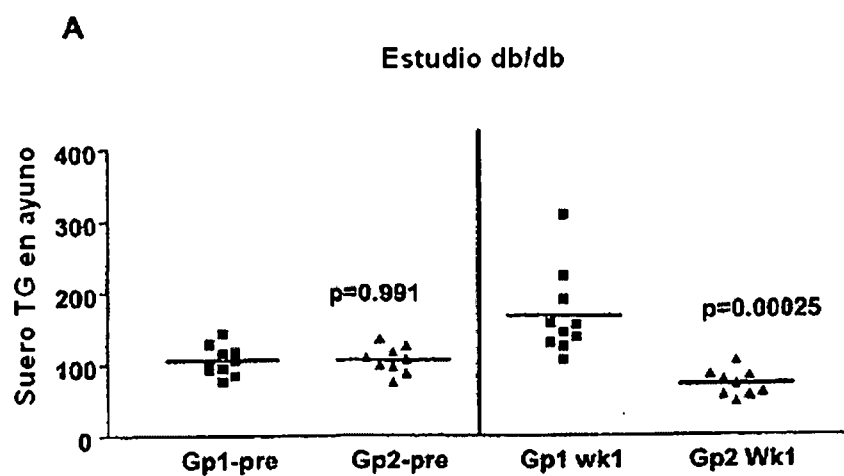


FIG. 46

FIG. 47

FR1					CDR1	FR2	CDR2				
1	10	20	30	40	50	60	70	84			
(1)	1										
14D12 VH	(1)	HNFGLSLIFLV	ILKGVQ	CEVKLVESGGGLVK	PGGSLKLS	CAASGFAFS	RYDHS	EVVROTPEKRL	EVVA	ISTGGSYTY	PPDSVK
15F2 VH	(1)	HNFGLSLIFLV	ILKGVQ	CEVKLVESGGGLVK	PGGSLKLS	CAASGFAFS	RYDHS	EVVROTPEKRL	EVVA	ISTDGSYTY	PPDSVK
90B4 VH	(1)	HGSSWIFLF	LNSETAGV	LSVQSQSGPEL	MKPGASVKN	SCRTSGYTPT	DYSDH	EVVROTPEKRL	EVVA	ISTGYNPN	YNGDTYCDQNF
Concenso	(1)	HNFGLSLIFLV	ILKGVQ	CEVKLVESGGGLVK	PGGSLKLS	CAASGFAFS	RYDHS	EVVROTPEKRL	EVVA	ISTGYSYTY	PPDSVK

FR3					CDR3		FR4		
	85	90	100	110	120	130	143		
(85)	GRFTISRDNARNTLYLQNGSLRSEDTALYFCVRHEQSTVPHYPPLDYWGQGT						143		SEQ ID NO: 12
14D12 VH	(85)	GRFTISRDNARNTLYLQNGSLRSEDTALYFCVRHEQSTVPHYPPLDYWGQGT							SEQ ID NO: 13
15F2 VH	(85)	GRFTISRDNARNTLYLQNGSLRSEDTALYFCVRHEQSTVPHYPPLDYWGQGT							SEQ ID NO: 14
90B4 VH	(85)	GKATATFNKASSTAYMEHPRLTSDQSAVYXCTRWKT-----IQAPFA							SEQ ID NO: 15
Concenso	(85)	GRFTISRDNARNTLYLQNGSLRSEDTALYFCVRHEQSTVPHYPPLDYWGQGT							

14D12 VH	15F2 VH	90B4 VH	
14D12 VH	100	99	40
15F2 VH		100	40
90B4 VH			100

FIG. 48

	FR1				CDR1		FR2		CDR2	
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	84
(1) 14D12 VK	--	WVST	SQ	LGL	L	L	L	L	L	L
(1) 15F2 VK	(1)	NDHR	AP	AO	FL	GILL	WFP	GAR	CE	IQ
(1) 90B4 VK	(1)	NDHR	AP	AO	FL	GILL	WFP	GAR	CE	IQ
Concense	(1)	NDHR	AP	AO	FL	GILL	WFP	GAR	CE	IQ

	FR3				CDR3		FR4	
	85	90	100	110	120	130		
(85) 14D12 VK	(85)	SGSG	SGSD	YSL	TISN	LESE	DFAD	YYQL
(85) 15F2 VK	(85)	SGSG	SGSD	YSL	TISN	LESE	DFAD	YYQL
(85) 90B4 VK	(85)	SGSG	SGSD	YSL	TISN	LESE	DFAD	YYQL
Concense	(85)	SGSG	SGSD	YSL	TISN	LESE	DFAD	YYQL

SEQ ID NO: 16
SEQ ID NO: 17
SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 19

	14D12 VK	15F2 VK	90B4 VK
14D12 VK	100	52	51
15F2 VK		100	99
90B4 VK			100

Mapeo de Epítipo del Anticuerpo ANGPTL4

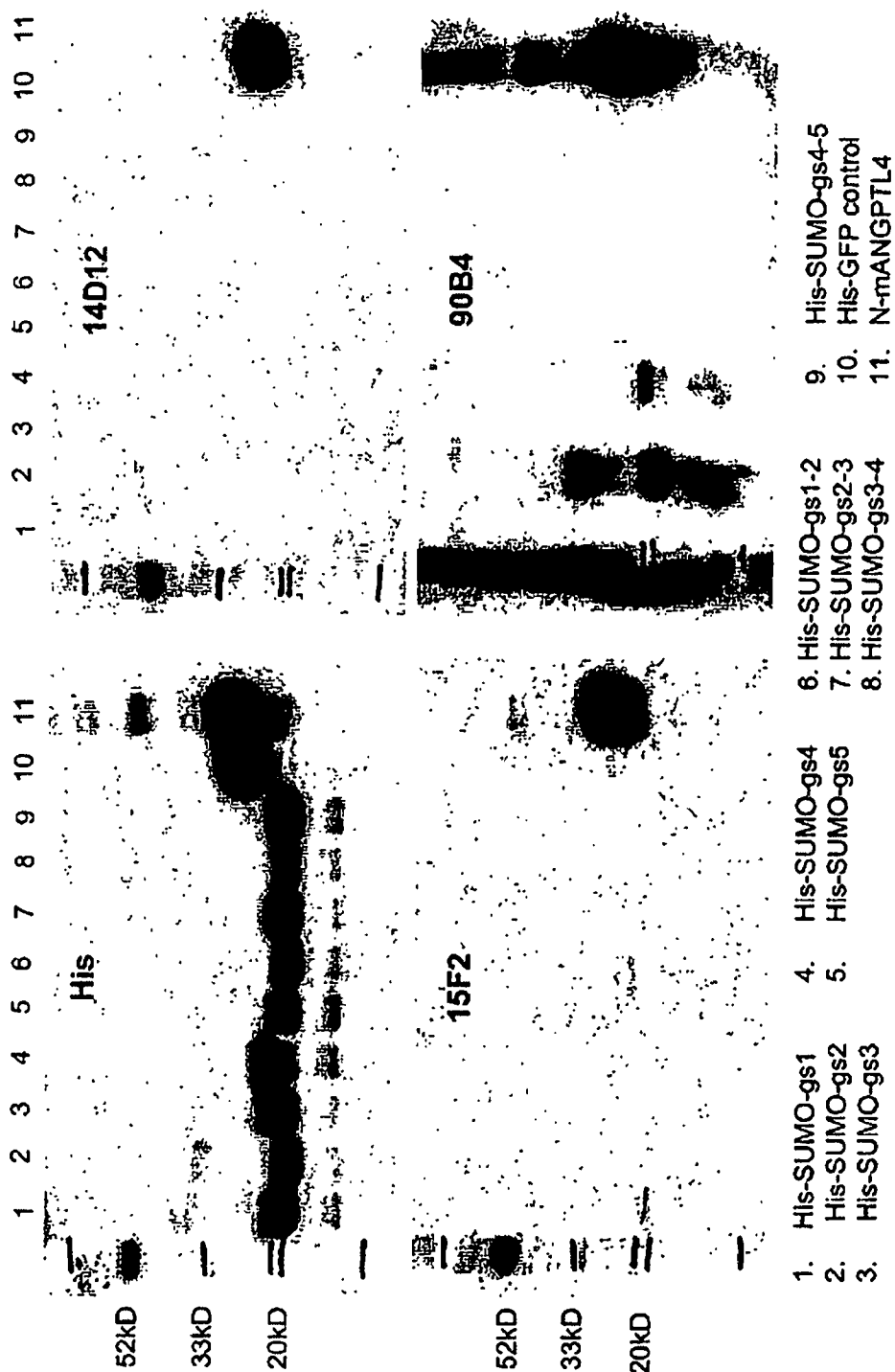


FIG. 49



Nº. 07-078108- -00000-0000

Fecha: 2007-07-31 16:28:17 Dep: 2020 NUECREACIONE
Tra: 11 PATENTEIYII Eje: 378 TASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 234



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

[x] ✓

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1 ✓
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1 ✓
- ◆ Descripción de la invención [x] 44 ✓
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 192 ✓
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2 ✓

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia