

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
CTA
bia
rismo

PROPIEDAD
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7

No. 13-286712- -00006-0000
Fecha: 2015-06-16 15:25:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 230

No. 15-137634- -00000-0000
Fecha: 2015-06-16 15:25:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 230

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD DIVISIONAL
DE PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL**

21. EXPEDIENTE No. 13.286.712

54. TITULO: METODOS PARA TRATAR O PREVENIR TRASTORNOS
RELACIONADOS CON EL COLESTEROL

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL:

71. SOLICITANTE: AMGEN, INC.

DOMICILIO: One Amgen Center Drive, Thousand Oaks,
California 91320, ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C., 16 JUN. 2015

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-286712-00006-0000

Fecha: 2015-06-16 15:25:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 230

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7



No. 15-137634-00000-0000

Fecha: 2015-06-16 15:25:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 230

mlf

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSION, DIVISION Y FUSION DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☐ Registro de Diseño Industrial
- ☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

AMGEN, INC.

Nombre o Denominación / Nombre social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	One Amgen Center Drive	Thousand Oaks, California 91320
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del representante o apoderado

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

Apellidos y Nombre

39.779.654 de Bogotá

Documento de Identificación

70.819 de C.S.J.

T.P. No.

Dirección del representante			Ciudad
Calle 94 A No. 7 A - 09			Bogotá
Dirección electrónica		No. Fax	Número telefónico
info@castellanosyco.co		7 550158	7 560770

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo general _____

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente _____	Expediente <u>13.286.712</u>	Expediente _____
De: _____	No.de Divisional <u>UNO (1)</u>	De: _____
A: _____		A: _____

5. Comprobante de Pago No.

15-00677 56
15-00677 57

Fecha

Junio 16 - 2015
Jun 16 2015

6. Anexos

- ☒ Comprobantes de pago de las tasas
- ☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
- ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- ☒ Texto de la descripción, reivindicaciones y resumen

7. Firma

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Nombre y Apellidos

Margarita Castellanos Abondano
Firma

39.779.654 de Bogotá
C.C.

70.819 C.S.J.
T.P.

PODER

El (los)
AMGEN, INC.

Domiciliados en

One Amgen Center Drive,
Thousand Oaks,
California 91320,
Estados Unidos de América

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso -administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- Para la obtención de registros sanitarios;
- Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy **6 de Agosto de 2008**

en **Thousand Oaks, Ventura County,
California, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

por **AMGEN, INC.**

Stuart L. Watt, Vice Presidente

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned
AMGEN, INC.

Of

One Amgen Center Drive,
Thousand Oaks,
California 91320,
United States of America

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, to

and to obtain the protection of my (our) Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- Obtainment of patents, ~~models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin, the deposit of trade names and signs;~~ its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- For the obtainment of Sanitary registrations;
- Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney. Based on PCT/2007/001714

Given and signed this Aug. 6, 2008

in Thousand Oaks, Ventura county, California USA

by Stuart L. Watt
Stuart L. Watt, Vice President, LAW
(Notary shall execute on the other side)

(Consular legalization or apostille is required)

State of California

SECRETARY OF STATE

For use in Colombia. All other use prohibited.

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 15th day of August 2008*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 574241*
9. *Seal/Stamp:*



10. Signature

Jeha Bowen
Secretary of State

BY _____



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of Ventura

On Aug. 6, 2008 before me, Christine Vu, Notary Public
Date Here Insert Name and Title of the Officer

personally appeared Stuart L. Watt
Name(s) of Signer(s)



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

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

WITNESS my hand and official seal.

Signature

Christine Vu

Signature of Notary Public

Place Notary Seal Above

OPTIONAL

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

Description of Attached Document

Title or Type of Document:

Power of Attorney

Document Date:

Number of Pages:

Signer(s) Other Than Named Above:

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: Stuart L. Watt

☐ Individual

☒ Corporate Officer — Title(s): VP, Law

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney in Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer Is Representing:

Amgen Inc.

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here

Signer's Name: _____

☐ Individual

☐ Corporate Officer — Title(s): _____

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney in Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER
Top of thumb here

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 202-08, DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS, SELLADO CON EL SELLO DEL SUSCRITO TRADUCTOR OFICIAL, HOY SEPTIEMBRE 22 DEL 2008, EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ D.C., REPÚBLICA DE COLOMBIA.

DOCUMENTO DE PODER DE AMGEN, INC. ESCRITO EN INGLÉS Y ESPAÑOL.

ADJUNTO AL DOCUMENTO SE ENCUENTRA LO SIGUIENTE:

CALIFORNIA - RECONOCIMIENTO DE TODO PROPÓSITO

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE VENTURA

EN AGOSTO 6, 2008, ANTE MI, CHRISTINE VU, NOTARIO PÚBLICO, COMPARECIO: STUART L WATT, QUIEN BASADO EN EVIDENCIA SATISFACTORIA COMPROBÓ QUE LA PERSONA CUYO NOMBRE ESTÁ SUSCRITO EN EL DOCUMENTO ADJUNTO Y RECONOCIÓ QUE HABÍA FIRMADO EL MISMO CON LA AUTORIZACIÓN CORRESPONDIENTE Y QUE POR MEDIO DE SU FIRMA EN EL INSTRUMENTO LA PERSONA O ENTIDAD A NOMBRE DE LA CUAL LA PERSONAS ACTUÓ, EJECUTO EL DOCUMENTO.

CERTIFICO BAJO GRAVEDAD DE JURAMENTO BAJO LAS LEYES DEL ESTADO DE CALIFORNIA QUE EL ANTERIOR PÁRRAFO ES AUTÉNTICO Y VERDADERO.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, FIRMO Y SELLO

FIRMADO POR NOTARIO PÚBLICO.

SELLO QUE REZA:

CHRISTINE VU - COMISIÓN No. 1704187 NOTARIO PÚBLICO DE CALIFORNIA
CONDADO DE VENTURA. MI COMISIÓN VENCE: NOV. 11, 2010.

OPCIONAL

Sergio Eleuterio Datorre M.
Traductor e Interpreté Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 1991

LA INFORMACIÓN A CONTINUACIÓN NO ES REQUERIDA POR LEY. SIN EMBARGO PUEDE PREVENIR EL ANEXO FRAUDULENTO DE ESTE RECONOCIMIENTO A UN DOCUMENTO NO AUTORIZADO.

DESCRIPCIÓN DE DOCUMENTO ADJUNTO

TIPO DE DOCUMENTO: DOCUMENTO DE PODER. FECHA DOCUMENTO: -

EL FIRMANTE REPRESENTA A: AMGEN INC.

ADJUNTO AL DOCUMENTO SE ENCUENTRA LO SIGUIENTE:

ESTADO DE CALIFORNIA

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTE DOCUMENTO PUBLICO
2. HA SIDO FIRMADO POR: CHRISTINE VU
3. ACTUANDO EN CAPACIDAD DE: NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE CALIFORNIA
4. LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE CHRISTINE VU, NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE CALIFORNIA
CERTIFICADO
5. EN: SACRAMENTO, CALIFORNIA
6. EL DIA: 15 DE AGOSTO DEL 2008.
7. POR: EL SECRETARIO DE ESTADO DELEGADO DEL ESTADO DE CALIFORNIA
8. No. 574241
9. SELLO/ESTAMPILLA
10. FIRMA

FIRMADO POR:

GRAN SELLO DORADO

SECRETARIO DE ESTADO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
2008 SET 22 A 11:46
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
821333
Sergio J. Latorre
NOTARIO PUBLICO
ESTADO DE CALIFORNIA
SACRAMENTO, CALIFORNIA
FIRMA Y SELLADO EN EL
LUGAR DE LAS FUNCIONES INDICADAS.

Sergio Latorre Latorre Mon. J. Latorre
Traductor e Interpretador Oficial
Resol. No. 7839 Minjusticia 1991

Delaware

PAGE 1

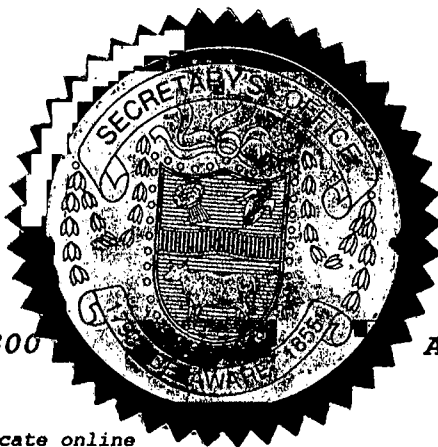
The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "AMGEN INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE NINTH DAY OF SEPTEMBER, A.D. 2008.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE SAID "AMGEN INC." WAS INCORPORATED ON THE THIRTY-FIRST DAY OF OCTOBER, A.D. 1986.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE FRANCHISE TAXES HAVE BEEN PAID TO DATE.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE ANNUAL REPORTS HAVE BEEN FILED TO DATE.



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2106150 8300

AUTHENTICATION: 6838898

080938427

DATE: 09-09-08

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the ninth day of September, A.D. 2008

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0363581

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 202-08, DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS, SELLADO CON EL SELLO DEL SUSCRITO TRADUCTOR OFICIAL, HOY SEPTIEMBRE 22 DEL 2008, EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ D.C., REPÚBLICA DE COLOMBIA.

DELAWARE

OFICINA DEL SECRETARIO DE ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIO DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR MEDIO DEL PRESENTE CERTIFICO QUE "AMGEN INC.", ESTA DEBIDAMENTE ESTABLECIDA BAJO LAS LEYES DE DELAWARE Y SE ENCUENTRA EN BUENA POSICION Y TIENE EXISTENCIA SOCIAL LEGAL SEGÚN DEMUESTRAN LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA, A SEPTIEMBRE NUEVE DEL 2008.

Y ADEMÁS CERTIFICO POR MEDIO DEL PRESENTE QUE ESTE "AMGEN INC." FUE ESTABLECIDA EL DÍA TREINTA Y UNO DE OCTUBRE DE 1986.

Y ADEMÁS CERTIFICO QUE LOS IMPUESTOS DE FRANQUICIA HAN SIDO PAGADOS HASTA EL PRESENTE.

Y ADEMÁS CERTIFICO QUE LOS INFORMES ANUALES HAN SIDO REGISTRADOS HASTA LA FECHA ACTUAL.

FIRMADO POR

HARRIET SMITH WINDSOR

SECRETARIO DE ESTADO

Sergio Eleuterio Gatorre Mesa
Traductor e Interpretador Oficial
Resol. No. 2639 Minjusticia 1991

GRAN SELLO DE LA OFICINA DEL SECRETARIO

2106150 8300

AUTENTICACION: 6838898

080938427

FECHA: 09-09-08

ADJUNTO AL DOCUMENTO SE ENCUENTRA LO SIGUIENTE:

APOSTILLE

(CONVENCION DE LA HAYE DE 5 OCTOBRE 1961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
- ESTE DOCUMENTO PUBLICO
2. HA SIDO FIRMADO POR: HARRIET SMITH WINDSOR
3. ACTUANDO EN CAPACIDAD DE: SECRETARIO DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE
4. LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE LA OFICINA DEL SECRETARIO DE ESTADO

CERTIFICADO

5. EN: DOVER, DELAWARE
6. EL DIA NUEVE DE SEPTIEMBRE, A.D. DEL 2008
7. POR: EL SECRETARIO DE ESTADO, DEPARTAMENTO DE ESTADO DE DELAWARE
8. CERTIFICADO No. 0363581
9. SELLO/ESTAMPILLA
10. FIRMA

FIRMADO POR: HARRIET SMITH WINDSOR

SECRETARIO DE ESTADO

SELLO DEL ESTADO DE DELAWARE

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
2008 SET 22 A 11:10 PM
JEFE DE LEGALIZACION
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
821332
Sello de la Oficina
del Secretario de Estado
del Departamento de Estado
de Delaware
Firmado por el Secretario de Estado
de Delaware

MÉTODOS PARA TRATAR O PREVENIR TRASTORNOS RELACIONADOS CON EL COLESTEROL

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense N.º 61/642.363, presentada el 3 de mayo de 2012, la solicitud provisional estadounidense N.º 61/614.417, presentada el 22 de marzo de 2012, la solicitud provisional estadounidense N.º 61/595.526, presentada el 6 de febrero de 2012, la solicitud provisional estadounidense N.º 61/562.303, presentada el 21 de noviembre de 2011, la solicitud provisional estadounidense N.º 61/484.610, presentada el 10 de mayo de 2011, todas las cuales se incorporan por referencia en el presente.

REFERENCIA A LA LISTA DE SECUENCIAS

La presente solicitud se presenta junto con una lista de secuencias en formato electrónico. La lista de secuencias se proporciona como un archivo titulado A-1635-WO-PCT_Sequence_Listing.txt, creado el 10 de mayo de 2012 y que tiene un tamaño de 315 KB. La información en el formato electrónico de la lista de secuencias se incorpora al presente por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a métodos para tratar o prevenir trastornos relacionados con el colesterol, por ejemplo hipercolesterolemia, hiperlipidemia o dislipidemia, que utilizan proteínas de unión a antígenos, incluso anticuerpos, contra la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9). También se describen formulaciones farmacéuticas y los métodos para producir dichas formulaciones.

ANTECEDENTES

Los "trastornos relacionados con el colesterol" (que incluyen "trastornos relacionados con el colesterol en suero") incluyen uno o más de los siguientes: hipercolesterolemia, hiperlipidemia, enfermedad cardíaca, síndrome metabólico, diabetes, enfermedad cardíaca coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedades cardiovasculares, mal de Alzheimer y generalmente dislipidemias, que se pueden manifestar, por ejemplo, por un colesterol en suero total elevado, LDL elevadas, triglicéridos elevados, VLDL elevadas y/o HDL bajas. La hipercolesterolemia es, de hecho, un factor de riesgo establecido para la enfermedad cardíaca coronaria (CHD) en los seres humanos. La reducción del colesterol de lipoproteínas de baja

densidad (LDL-C) produce una reducción del riesgo cardiovascular y es un objetivo principal en la farmacoterapia para CHD. Actualmente las estatinas (inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A [HMG CoA] reductasa) son el tratamiento de elección para la hipercolesterolemia. Sin embargo, nuevos datos indican que el tratamiento más agresivo de la hipercolesterolemia está asociado con un menor riesgo de eventos de CHD. Además, un subconjunto de pacientes son intolerantes, o no responden adecuadamente, a la terapia con estatinas. Por lo tanto, pueden ser útiles las nuevas terapias que se puedan utilizar solas o en combinación con los agentes existentes para reducir de manera más eficaz el LDL-C.

Está establecido que el reciclaje del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) de la superficie celular hepático desempeña un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio del colesterol celular y de todo el cuerpo al regular los niveles de LDL-C en el plasma. Más recientemente, se ha demostrado que la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) cumple una función importante en el reciclaje y regulación del LDLR. La PCSK9 es un miembro de la familia de subtilisina de serina proteasas y se expresa principalmente en el hígado. Luego de la secreción, produce una regulación por disminución postraducciona del LDLR de la superficie celular hepático a través de un mecanismo que implica la unión directa al LDLR. La regulación por disminución del LDLR hepático, a su vez, produce mayores niveles de LDL-C circulante. Por lo tanto, la PCSK9 puede representar una diana para la inhibición a través de nuevos agentes terapéuticos en la reducción de hipercolesterolemia. Un sólido fundamento de este enfoque se encuentra disponible en los estudios en modelos preclínicos y en los hallazgos de que los seres humanos con mutaciones de pérdida de función de PCSK9 tienen niveles de colesterol menores que normal e incidencia reducida de CHD.

COMPENDIO DE LAS DIVERSAS REALIZACIONES

En algunos aspectos de la invención se proporciona una formulación estable que comprende al menos un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a PCSK9, en donde PCSK9 comprende los aminoácidos de SEC. ID. N.º: 1, el anticuerpo monoclonal en una cantidad de entre aproximadamente 40 mg/ml y aproximadamente 300 mg/ml, un tampón farmacéuticamente aceptable en una cantidad de entre aproximadamente 0,05 mM y aproximadamente 40 mM, un surfactante farmacéuticamente aceptable en una cantidad que es entre aproximadamente el 0,01 % p/v y aproximadamente el 20 % p/v, al menos un estabilizador farmacéuticamente aceptable de entre aproximadamente el 0,5 % p/v y aproximadamente el 10 % w/v, en donde la formulación estable tiene un pH de entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 6,0. En algunas realizaciones la formulación estable

anterior comprende un tampón farmacéuticamente aceptable escogido del grupo que consiste en glutamato, fosfato, salina con tampón de fosfato, acetato sódico, citrato de sodio y tampón Tris. En realizaciones específicas el tampón farmacéuticamente aceptable de la formulación estable anterior está presente en una cantidad de 10-20 mM. En una realización específica el
5 tampón farmacéuticamente aceptable es acetato sódico en la cantidad de 10-20 mM. En algunas realizaciones, el surfactante farmacéuticamente aceptable está presente en una cantidad de entre aproximadamente el 0,004% p/v y aproximadamente el 0,01 % p/v. En realizaciones específicas el surfactante farmacéuticamente aceptable de la formulación estable anterior es polisorbato 80 o polisorbato 20. En otras realizaciones el surfactante
10 farmacéuticamente aceptable es polisorbato 80 o polisorbato 20 presente en una cantidad de entre aproximadamente el 0,004 % p/v y aproximadamente el 0,01 % p/v.

En algunas realizaciones el estabilizador farmacéuticamente aceptable de la formulación estable anterior se selecciona del grupo que consiste en un polihidroxi hidrocarburo, un disacárido, un poliol, prolina, arginina, lisina, metionina, taurina y alcohol bencílico. En
15 algunas realizaciones el estabilizador farmacéuticamente aceptable es un polihidroxi hidrocarburo seleccionado del grupo que consiste en sorbital, manitol y glicerol. En una realización específica, el polihidroxi hidrocarburo de la formulación estable anterior es sorbital. En algunas realizaciones el estabilizador farmacéuticamente aceptable es un disacárido seleccionado del grupo que consiste en sucrosa, maltosa, lactosa, fructosa y trehalosa. En
20 algunas realizaciones el estabilizador disacárido está presente en una cantidad de aproximadamente el 9 % p/v. En algunas realizaciones, dicho disacárido es sucrosa. En realizaciones específicas la sucrosa está presente en la formulación estable anterior en una cantidad de aproximadamente el 9 % p/v. En algunas realizaciones el estabilizador es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en prolina, arginina, lisina, metionina y taurina.
25 En una realización particular el estabilizador es prolina. En otra realización la prolina está presente en la formulación estable anterior en una cantidad de entre aproximadamente el 2 % y el 3 % p/v. En algunas realizaciones, el pH de la formulación estable anterior es entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 5,5.

En algunas realizaciones la formulación estable anterior comprende un anticuerpo
30 monoclonal que comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 49; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID.

N.º: 12 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 67; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 461 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 459; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende una amino secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 463, o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 485 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 483.

En algunas realizaciones la formulación estable anterior incluye un anticuerpo monoclonal que comprende: una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 49; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 12 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 67; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 461 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 459; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 463 o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 485 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 483.

En algunas realizaciones, la formulación estable anterior comprende el anticuerpo monoclonal 21B12, 31H4, 8A3, 11F1 o 8A1.

En algunas realizaciones, la formulación estable anterior comprende una viscosidad de 30 cP o menos a 25 °C. En realizaciones específicas, en la formulación estable anterior el anticuerpo monoclonal está presente entre aproximadamente 70 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml y la formulación estable comprende una viscosidad de 12 cP o menos a 25 °C. En algunas realizaciones la formulación estable anterior comprende una osmolalidad de entre aproximadamente 250 mOsmol/kg y aproximadamente 350 mOsmol/kg. En algunas realizaciones, la formulación estable anterior permanece estable durante al menos 3, 6, 12 o 24

meses.

En realizaciones específicas, la formulación estable anterior comprende un anticuerpo monoclonal que tiene una región variable que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID.

- 5 N.º: 463. En algunas realizaciones la formulación estable anterior comprende un anticuerpo monoclonal que tiene una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 463 y en donde la cantidad de anticuerpo monoclonal es aproximadamente 150.

- 10 En algunas realizaciones, la formulación estable anterior comprende un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 49. En algunas realizaciones, la formulación estable anterior comprende un anticuerpo monoclonal que tiene una región variable de cadena ligera que comprende la
- 15 secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 49 y en donde la cantidad del anticuerpo monoclonal es aproximadamente 120 mg/ml o 140 mg/ml.

- En realizaciones específicas la formulación estable anterior comprende (a) un anticuerpo monoclonal en una cantidad de entre aproximadamente 70 mg/ml y
- 20 aproximadamente 200 mg/ml, dicho anticuerpo monoclonal comprende: una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 49; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 12 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos
- 25 de SEC. ID. N.º: 67; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 461 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 459; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 463, o una región
- 30 variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 485 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 483 y aproximadamente 10 mM de acetato sódico; aproximadamente el 9,0 % p/v de sucrosa; aproximadamente entre el 0,004 % y aproximadamente el 0,01 % p/v de polisorbato 20 o polisorbato 80 y un pH de aproximadamente 5,2.

En este aspecto el anticuerpo monoclonal puede ser 21B12, 8A3, 11F1. En realizaciones específicas de este aspecto, el anticuerpo monoclonal es 21B12 y está presente en la formulación estable anterior en una cantidad de aproximadamente 140 mg/ml. En otras realizaciones de este aspecto la formulación estable de las reivindicaciones comprende
5 aproximadamente el 0,004 % de polisorbato 20. En otras realizaciones específicas de este aspecto la formulación estable anterior que comprende el anticuerpo monoclonal es 8A3 que está presente en una cantidad de aproximadamente 150 mg/ml.

En otras realizaciones de este aspecto, la formulación estable anterior que comprende el anticuerpo monoclonal es 11F1 en una cantidad de aproximadamente 140, 150, 160, 170,
10 180, 190 o 200 mg/ml. En realizaciones específicas, la formulación estable que comprende 11F1 también comprende aproximadamente el 0,01 % de polisorbato 80.

En otra realización, la formulación estable comprende (a) un anticuerpo monoclonal en una cantidad de entre aproximadamente 70 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml, dicho anticuerpo monoclonal comprende: una región variable de cadena ligera que comprende la
15 secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 49; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 12 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 67; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 461 y
20 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 459; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 463, o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 485 y una región variable de cadena pesada que
25 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 483 y aproximadamente 10 mM de acetato sódico; entre aproximadamente el 2,0 % y el 3,0 % p/v de prolina; aproximadamente el 0,01 % p/v de polisorbato 20 o polisorbato 80 y un pH de aproximadamente 5,0. En algunas realizaciones de este aspecto, la formulación estable que comprende el anticuerpo monoclonal es 21B12, 8A3 o 11F1.

30 En otro aspecto de la invención, una formulación estable, que comprende un anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 en una cantidad de entre aproximadamente 70 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml, dicho anticuerpo monoclonal comprende: una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEC. ID. N.º: 577 y una región variable de cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEC. ID. N.º: 576; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 577 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 576; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEC. ID. N.º: 588 y región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEC. ID. N.º: 589 o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 588 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 589; y (b) aproximadamente 10 mM de acetato sódico; (c) aproximadamente el 9,0 % p/v de sucrosa; (d) entre aproximadamente el 0,004 % y aproximadamente el 0,01 % p/v de polisorbato 20 o polisorbato 80 y (e) un pH de aproximadamente 5,2.

En otro aspecto de la invención, una formulación estable, que comprende un anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 en una cantidad de entre aproximadamente 70 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml, dicho anticuerpo monoclonal comprende: una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEC. ID. N.º: 577 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEC. ID. N.º: 576; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 577 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 576; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEC. ID. N.º: 588 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEC. ID. N.º: 589 o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 588 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 589; y (b) aproximadamente 10 mM de acetato sódico; (c) entre aproximadamente el 2,0 % y el 3,0 % p/v de prolina; (d) aproximadamente el 0,01 % p/v de polisorbato 20 o polisorbato 80 y (e) un pH de aproximadamente 5,0.

En algunos aspectos, la invención proporcionada comprende un método para reducir el colesterol LDL en suero en un paciente que comprende la administración de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 al paciente que lo necesite en una dosis de entre aproximadamente

10 mg y aproximadamente 3000 mg, disminuyendo así el nivel de dicho colesterol LDL en suero en al menos aproximadamente el 15 %, en comparación con un nivel predosis del colesterol LDL en suero en el paciente. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el nivel de colesterol LDL en suero de dicho paciente se reduce en al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 % o al menos aproximadamente el 90 % en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero en el paciente.

En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 2800 mg, de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 2500 mg, de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 2000 mg, de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 1800 mg, de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 1400 mg, de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 1200 mg, de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 1000 mg, de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 700 mg, de entre aproximadamente 45 mg y aproximadamente 700 mg, de entre aproximadamente 45 mg y aproximadamente 600 mg, de entre aproximadamente 45 mg y aproximadamente 450 mg, de entre aproximadamente 70 mg y aproximadamente 450 mg, de entre aproximadamente 105 mg y aproximadamente 420 mg, de entre aproximadamente 120 mg y aproximadamente 200 mg, de entre aproximadamente 140 mg y aproximadamente 200 mg, de entre aproximadamente 140 mg y aproximadamente 180 mg o de entre aproximadamente 140 mg y aproximadamente 170 mg, de entre aproximadamente 420 mg y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 700 mg y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 1000 mg y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 1200 y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 1400 mg y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 1800 mg y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 2000 mg y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 2400 mg y aproximadamente 3000 mg o de entre aproximadamente 2800 mg y aproximadamente 3000 mg. En algunas realizaciones de este aspecto, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 35 mg, de aproximadamente 45 mg, de aproximadamente 70 mg, de

aproximadamente 105 mg, de aproximadamente 120 mg, de aproximadamente 140 mg, de aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 160 mg, de aproximadamente 170 mg, de aproximadamente 180 mg, de aproximadamente 190 mg, de aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 210 mg, de aproximadamente 280 mg, de aproximadamente 360 mg, de aproximadamente 420 mg, de aproximadamente 450 mg, de aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 700 mg, de aproximadamente 1200 mg, de aproximadamente 1400 mg, de aproximadamente 1800 mg, de aproximadamente 2000 mg, de aproximadamente 2500 mg, de aproximadamente 2800 mg o de aproximadamente 3000 mg.

En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra a un paciente en un plan seleccionado del grupo que consiste en: (1) una vez por semana, (2) una vez cada dos semanas, (3) una vez por mes, (4) una vez cada dos meses, (5) una vez cada tres meses (6) una vez cada seis meses y (7) una vez cada doce meses. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención el anticuerpo anti-PCSK9 se administra por vía parenteral. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra por vía subcutánea.

En algunas realizaciones de este aspecto de la invención el anticuerpo anti-PCSK9 comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 49; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 12 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 67; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 461 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 459; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 463; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 485 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 483; o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos

que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 582 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 583. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención el anticuerpo anti-PCSK9 comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos, SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos, SEC. ID. N.º: 49; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos, SEC. ID. N.º: 12 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos, SEC. ID. N.º: 67; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos SEC. ID. N.º: 461 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos SEC. ID. N.º: 459; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 465 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 463; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 485 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 483; o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos, SEC. ID. N.º: 582 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos, SEC. ID. N.º: 583. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención el anticuerpo anti-PCSK9 se selecciona del grupo que consiste en 21B12, 31H4, 8A3, 11F1 y 8A1.

En algunos aspectos, la invención comprende un método para tratar o prevenir un trastorno relacionado con el colesterol en un paciente que tiene un nivel de colesterol LDL en suero que comprende la administración de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 al paciente que lo necesite en una dosis de entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 3000 mg, tratando o previendo así el trastorno relacionado con el colesterol en el paciente. En un aspecto de esta realización, el trastorno relacionado con el colesterol que se tratará o prevendrá es hipercolesterolemia familiar, incluso hipercolesterolemia familiar heterocigótica y hipercolesterolemia familiar homocigótica, hipercolesterolemia no familiar, lipoproteína elevada (a), enfermedad cardíaca, síndrome metabólico, diabetes, enfermedad cardíaca coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad cardiovascular, mal de Alzheimer, enfermedad arterial periférica, hiperlipidemia o dislipidemia. En algunas realizaciones de este aspecto, el nivel de colesterol LDL en suero de dicho paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos

aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 % o al menos aproximadamente el 90 % en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero en dicho paciente.

5 En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 2800 mg, de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 2500 mg, de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 2000 mg, de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 1800 mg, de
10 entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 1400 mg, de entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 1200 mg, de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 1000 mg, de entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 700 mg, de entre aproximadamente 45 mg y aproximadamente 700 mg, de entre aproximadamente 45 mg y aproximadamente 600 mg, de entre aproximadamente 45 mg y aproximadamente 450 mg, de entre
15 aproximadamente 70 mg y aproximadamente 450 mg, de entre aproximadamente 105 mg y aproximadamente 420 mg, de entre aproximadamente 120 mg y aproximadamente 200 mg, de entre aproximadamente 140 mg y aproximadamente 200 mg, de entre aproximadamente 140 mg y aproximadamente 180 mg o de entre aproximadamente 140 mg y aproximadamente 170 mg, de entre aproximadamente 420 mg y aproximadamente 3000 mg, de entre
20 aproximadamente 700 mg y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 1000 mg y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 1200 y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 1400 mg y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 1800 mg y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 2000 mg y aproximadamente 3000 mg, de entre aproximadamente 2400 mg y aproximadamente 3000 mg
25 o de entre aproximadamente 2800 mg y aproximadamente 3000 mg. En algunas realizaciones de este aspecto, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 35 mg, de aproximadamente 45 mg, de aproximadamente 70 mg, de aproximadamente 105 mg, de aproximadamente 120 mg, de aproximadamente 140 mg, de aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 160 mg, de aproximadamente 170 mg, de
30 aproximadamente 180 mg, de aproximadamente 190 mg, de aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 210 mg, de aproximadamente 280 mg, de aproximadamente 360 mg, de aproximadamente 420 mg, de aproximadamente 450 mg, de aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 700 mg, de aproximadamente 1200 mg, de aproximadamente 1400 mg, de aproximadamente 1800 mg, de aproximadamente 2000 mg, de aproximadamente 2500 mg, de

aproximadamente 2800 mg o de aproximadamente 3000 mg.

En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra a un paciente en un plan seleccionado del grupo que consiste en: (1) una vez por semana, (2) una vez cada dos semanas, (3) una vez por mes, (4) una vez cada dos meses, (5) una vez cada tres meses (6) una vez cada seis meses y (7) una vez cada doce meses. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención el anticuerpo anti-PCSK9 se administra por vía parenteral. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra por vía subcutánea.

En algunas realizaciones de este aspecto de la invención el anticuerpo anti-PCSK9 comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 49; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 12 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 67; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 461 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 459; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 463; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 485 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 483; o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 582 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 583. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención el anticuerpo anti-PCSK9 comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos, SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos, SEC. ID. N.º: 49; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos, SEC. ID. N.º: 12 y una región variable de cadena

pesada que comprende una secuencia de aminoácidos, SEC. ID. N.º: 67; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos SEC. ID. N.º: 461 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos SEC. ID. N.º: 459; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 465 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 463; una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 485 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 483; o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos, SEC. ID. N.º: 582 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos, SEC. ID. N.º: 583. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención el anticuerpo anti-PCSK9 se selecciona del grupo que consiste en 21B12, 31H4, 8A3, 11F1 y 8A1.

En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra a un paciente en un plan seleccionado del grupo que consiste en: (1) una vez por semana, (2) una vez cada dos semanas, (3) una vez por mes, (4) una vez cada dos meses, (5) una vez cada tres meses (6) una vez cada seis meses y (7) una vez cada doce meses. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención el anticuerpo anti-PCSK9 se administra por vía parenteral. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra por vía subcutánea.

En realizaciones específicas de la invención, el anticuerpo anti-PCSK9 es 21B12 y 31H4. En algunas realizaciones el anticuerpo anti-PCSK9 comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 49. En algunas realizaciones el anticuerpo anti-PCSK9 comprende: una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 49. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PCSK9 es 21B12. En una realización particular en donde el anticuerpo anti-PCSK9 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 49 o comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEC. ID. N.º: 49, o si el anticuerpo es 21B12, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 21 mg y aproximadamente 70 mg por vía subcutánea una vez por semana, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos el 15-50 % durante aproximadamente 3-10 días; se

5 administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 21 mg por vía subcutánea una vez por semana, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 3-10 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 35 mg por vía subcutánea una vez por semana, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-

10 50 % durante aproximadamente 3-10 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 70 mg por vía subcutánea una vez por semana, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 3-10 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 70 mg y aproximadamente 280 mg por vía subcutánea una vez cada dos

15 semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 7-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 70 mg por vía subcutánea una vez cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 7-14 días; se administra a un paciente en una dosis de

20 aproximadamente 105 mg por vía subcutánea una vez cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 7-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 120 mg por vía subcutánea una vez cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-50 %

25 durante aproximadamente 7-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 140 mg por vía subcutánea una vez cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 7-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 210 mg por vía subcutánea una vez cada dos semanas, en donde el nivel de

30 colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 7-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 280 mg por vía subcutánea una vez cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 7-14 días; se administra a un paciente en una dosis de entre

aproximadamente 280 mg y aproximadamente 420 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 21-31 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 280 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro
5 semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 21-31 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 350 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-50 % durante 21-31 días; se administra a un paciente en una dosis de
10 aproximadamente 420 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 21-31 días.

En otra realización particular, en donde el anticuerpo anti-PCSK9 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 23 y una
15 región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 49, o comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 49, o si el anticuerpo es 21B12, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra a un paciente en una dosis de
20 entre aproximadamente 420 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa otra semana, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 3-10 días, se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 700 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 3-10 días; se administra a un paciente
25 en una dosis de aproximadamente 1200 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 3-10 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente mayor que 1200 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 3-10
30 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 420 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 7-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 700 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 %

durante aproximadamente 7-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 1200 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 21-31 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente mayor que 1200 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 7-14 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 420 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 21-31 días, se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 700 mg por vía intravenosa cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 21-31 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 1200 mg por vía intravenosa cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 21-31 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente mayor que 1200 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 21-31 días.

En otra realización particular en donde el anticuerpo anti-PCSK9 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 49 o comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 49 o si el anticuerpo es 21B12, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 21 mg por vía subcutánea una vez por semana, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 7-10 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 35 mg por vía subcutánea una vez por semana, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 7-10 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 70 mg por vía subcutánea una vez por semana, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 7-10 días; se administra a un paciente en una dosis de

- aproximadamente 70 mg por vía subcutánea una vez cada dos semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 105 mg por vía subcutánea una vez cada dos semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 120 mg por vía subcutánea una vez cada dos semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 140 mg por vía subcutánea una vez cada dos semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 210 mg por vía subcutánea una vez cada dos semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 280 mg por vía subcutánea una vez cada dos semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 280 mg y aproximadamente 420 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 24-28 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 280 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 24-28 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 350 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 24-28 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 420 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 24-28 días.
- En otra realización particular, en donde el anticuerpo anti-PCSK9 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 49, o comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 23 y una región variable de

cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 49, o si el anticuerpo es 21B12, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 420 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa otra semana, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante

5 aproximadamente 7-10 días, se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 700 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 7-10 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 1200 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente

10 7-10 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente mayor que 1200 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 7-10 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 420 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de

15 colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 700 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 1200 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de

20 colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente mayor que 1200 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 420 mg y

25 aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 24-28 días, se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 700 mg por vía intravenosa cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 24-28 días; se administra a un paciente en una dosis de

30 aproximadamente 1200 mg por vía intravenosa cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 24-28 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente mayor que 1200 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 24-28

días.

En realizaciones específicas de la invención, el anticuerpo anti-PCSK9 es 8A3, 11F1 y 8A1. En algunas realizaciones el anticuerpo anti-PCSK9 comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 463. En algunas realizaciones el anticuerpo anti-PCSK9 comprende: una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 463. En algunas realizaciones el anticuerpo anti-PCSK9 es 11F1. En una realización particular, en donde el anticuerpo anti-PCSK9 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 463, o comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 463, o si el anticuerpo es 11F1, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 45 mg por vía subcutánea una vez por semana en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 3-10 días, se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 150 mg por vía subcutánea una vez cada dos semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 7-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 150 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 21-31 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente mayor que 150 mg y aproximadamente 200 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 21-31 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 170 mg y aproximadamente 180 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 21-31 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 150 mg y aproximadamente 170 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 %

durante aproximadamente 21-31 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 450 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 21-31 días; se administra a un paciente en una dosis de entre

5 aproximadamente 150 mg por vía subcutánea una vez cada seis semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 31-42 días; se administra a un paciente en una dosis de entre

10 aproximadamente mayor que 150 mg y aproximadamente 200 mg por vía subcutánea una vez cada seis semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 31-42 días; se administra a un

15 paciente en una dosis de entre aproximadamente 170 mg y aproximadamente 180 mg por vía subcutánea una vez cada seis semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 31-42 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 150 mg y

20 aproximadamente 170 mg por vía subcutánea una vez cada seis semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 31-42 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 140 mg y

25 aproximadamente 200 mg por vía subcutánea cada ocho semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 45-56 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 170 mg y

30 aproximadamente 180 mg por vía subcutánea cada ocho semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 45-56 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 150 mg y

aproximadamente 170 mg por vía subcutánea cada ocho semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 45-56 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 450 mg por vía subcutánea

cada ocho semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 15-50 % durante aproximadamente 45-56 días; en una dosis de aproximadamente 600 mg por vía subcutánea cada ocho semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 45-56 días; en una dosis de aproximadamente 700 mg por vía subcutánea cada ocho semanas en donde el nivel

de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 45-56 días; en una dosis de aproximadamente 600 mg por vía subcutánea una vez cada doce semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 74-84 días; en una dosis de aproximadamente 700 mg por vía subcutánea una vez cada doce semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 74-84 días; en una dosis de aproximadamente 600 mg por vía subcutánea una vez cada dieciséis semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 100-112 días; en una dosis de aproximadamente 700 mg por vía subcutánea una vez cada dieciséis semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente 100-112 días.

En realizaciones específicas de la invención en donde el anticuerpo anti-PCSK9 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 463 o comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 463 o si el anticuerpo es 11F1, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 45 mg por vía subcutánea una vez por semana en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 7-10 días, se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 150 mg por vía subcutánea una vez cada dos semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 150 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce en al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 24-28 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente mayor que 150 mg y aproximadamente 200 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 24-28 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 170 mg y aproximadamente 180 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del

- paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 24-28 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 150 mg y aproximadamente 170 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 %
- 5 durante aproximadamente 24-28 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 450 mg por vía subcutánea una vez cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 24-28 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 150 mg por vía subcutánea una vez cada seis semanas en donde el nivel de
- 10 colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 40-41 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente mayor que 150 mg y aproximadamente 200 mg por vía subcutánea una vez cada seis semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 40-41 días; se administra a un
- 15 paciente en una dosis de entre aproximadamente 170 mg y aproximadamente 180 mg por vía subcutánea una vez cada seis semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 40-41 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 150 mg y aproximadamente 170 mg por vía subcutánea una vez cada seis semanas en donde el nivel de
- 20 colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 40-41 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 450 mg por vía subcutánea una vez cada seis semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 40-41 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 140 mg y
- 25 aproximadamente 200 mg por vía subcutánea cada ocho semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 50-56 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 170 mg y aproximadamente 180 mg vía subcutánea cada ocho semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante
- 30 aproximadamente 50-56 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 150 mg y aproximadamente 170 mg por vía subcutánea cada ocho semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 50-56 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 450 mg por vía subcutánea cada ocho semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero

del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 50-56 días; en una dosis de aproximadamente 600 mg por vía subcutánea una vez cada ocho semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 50-56 días; en una dosis de aproximadamente 700 mg por vía subcutánea una vez cada ocho semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 50-56 días; en una dosis de aproximadamente 600 mg por vía subcutánea una vez cada doce semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 80-84 días; en una dosis de aproximadamente 700 mg por vía subcutánea una vez cada doce semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 80-84 días; en una dosis de aproximadamente 600 mg por vía subcutánea una vez cada dieciséis semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 105-112 días; en una dosis de aproximadamente 700 mg por vía subcutánea una vez cada dieciséis semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente 105-112 días.

En realizaciones específicas de la invención en donde el anticuerpo anti-PCSK9 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEC. ID. N.º: 463 o comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N.º: 463 o si el anticuerpo es 11F1, el anticuerpo anti-PCSK9 se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 420 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cada semana, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 7-10 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 700 mg por vía intravenosa cada semana, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 7-10 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 1200 mg por vía intravenosa cada semana, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 7-10 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente mayor que 1200 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cada semana, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 %

- durante aproximadamente 7-10 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 420 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa otra semana, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente
- 5 700 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 1200 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de entre
- 10 aproximadamente mayor que 1200 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cada dos semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 10-14 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente 420 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante
- 15 aproximadamente 24-28 días, se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 700 mg por vía intravenosa cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 24-28 días; se administra a un paciente en una dosis de aproximadamente 1200 mg por vía intravenosa cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante
- 20 aproximadamente 24-28 días; se administra a un paciente en una dosis de entre aproximadamente mayor que 1200 mg y aproximadamente 3000 mg por vía intravenosa cada cuatro semanas, en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce el 30-50 % durante aproximadamente 24-28 días; se administra en una dosis de aproximadamente 1000 mg – 3000 mg por vía intravenosa una vez cada veinticuatro semanas en donde el nivel
- 25 de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente de 150 a 168 días; se administra en una dosis de aproximadamente 1000 mg – 3000 mg por vía intravenosa una vez cada veinticuatro semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 % durante aproximadamente de 160 a 168 días; se administra en una dosis de aproximadamente
- 30 1000 mg – 3000 mg por vía intravenosa una vez cada cincuenta y dos semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 15-50 % durante aproximadamente de 350 a 365 días; se administra en una dosis de aproximadamente 1000 mg – 3000 mg por vía intravenosa una vez cada cincuenta y dos semanas en donde el nivel de colesterol LDL en suero del paciente se reduce al menos aproximadamente el 30-50 %

durante aproximadamente de 360 a 365 días.

En otro aspecto de la invención, el o los anticuerpos anti-PCSK9 se administran al paciente antes, después o simultáneamente con al menos otro agente reductor de colesterol diferente. Los agentes reductores de colesterol incluyen estatinas, incluso, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina, ácido nicotínico (niacina), niacina de liberación lenta (SLO-NIACIN), laropirant (CORDAPTIVE), ácido fibríco (LOPID (gemfibrozilo), TRICOR (fenofibrato)), secuestradores de ácidos biliares, por ejemplo colestiramina (QUESTRAN), colesevelam (WELCHOL), COLESTID (colestipol)), inhibidor de la absorción de colesterol (ZETIA (ezetimiba)), agentes modificadores de lípidos, agonistas de PPAR gamma, agonistas de PPAR alfa/gamma, inhibidores de escualeno sintasa, inhibidores de CETP, antihipertensivos, agentes anti-diabéticos, incluso sulfonilureas, insulina, análogos de GLP-1, inhibidores de DDPIV, moduladores de ApoB, inhibidores de MTP y/o tratamientos de la arteriosclerosis obliterante, oncostatina M, estrógeno, berberina y agentes terapéuticos para un trastorno relacionado con la inmunidad.

En algunos aspectos, la invención comprende un método para reducir el nivel de colesterol LDL en suero en un paciente. El método comprende administrarle a un paciente que lo necesite una dosis de entre aproximadamente 10 mg y 3000 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 descrito en el presente. En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 70 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez por semana (QW). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 14 mg y aproximadamente 45 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez por semana. En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 14 mg y aproximadamente 35 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez por semana. En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 70 mg y aproximadamente 420 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada dos semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 70 mg y aproximadamente 350 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada dos semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 105 mg y aproximadamente 350 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada dos semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 140 mg y aproximadamente 280 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada dos semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 250 mg y aproximadamente 480 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, la dosis es entre

aproximadamente 280 mg y aproximadamente 420 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 350 mg y aproximadamente 420 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, la dosis es entre

5 aproximadamente 420 mg y aproximadamente 3000 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez por semana (QW). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 1000 mg y aproximadamente 3000 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez por semana (QW). En algunas realizaciones, la dosis es entre

10 aproximadamente 2000 mg y aproximadamente 3000 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez por semana (QW). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 420 mg y aproximadamente 3000 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada dos semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es entre

15 entre aproximadamente 1000 mg y aproximadamente 3000 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada dos semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 2000 mg y aproximadamente 3000 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada dos semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es entre

20 entre aproximadamente 420 mg y aproximadamente 3000 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez por mes (Q4W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 1000 mg y aproximadamente 3000 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez por mes (Q4W). En algunas realizaciones, la dosis es entre

25 aproximadamente 2000 mg y aproximadamente 3000 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez por mes (Q4W). En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 15 % en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 20 %. En algunas realizaciones, el nivel de

30 colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 25 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 30 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 35 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 40 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 45 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos

aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 75 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 70 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 75 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 80 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 85 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 90 %.

En algunos aspectos, la invención comprende un método para reducir el colesterol LDL en suero en un paciente, el cual método comprende administrarle a un paciente que lo necesite una dosis de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 y en donde la dosis del anticuerpo anti-PCSK9 se administra en un plan seleccionado del grupo que consiste en: (1) al menos aproximadamente 14 mg cada semana (QW); (2) al menos una cantidad de aproximadamente 35 mg cada semana (QW); (3) al menos una cantidad de aproximadamente 45 mg cada semana (QW); (4) al menos una cantidad de aproximadamente 70 mg cada dos semanas (Q2W); (5) al menos una cantidad de aproximadamente 105 mg cada dos semanas (Q2W); (6) al menos una cantidad de aproximadamente 140 mg cada dos semanas (Q2W); (7) al menos una cantidad de aproximadamente 150 mg cada dos semanas (Q2W); (8) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada dos semanas (Q2W); y (9) al menos una cantidad de aproximadamente 150 mg cada cuatro semanas (Q4W); (10) al menos una cantidad de aproximadamente 160 mg cada cuatro semanas (Q4W); (11) al menos una cantidad de aproximadamente 170 mg cada cuatro semanas (Q4W); (12) al menos una cantidad de aproximadamente 180 mg cada cuatro semanas (Q4W); (13) al menos una cantidad de aproximadamente 190 mg cada cuatro semanas (Q4W); (14) al menos una cantidad de aproximadamente 200 mg cada cuatro semanas (Q4W); (15) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada cuatro semanas (Q4W); (16) al menos una cantidad de aproximadamente 350 mg cada cuatro semanas (Q4W); (17) al menos una cantidad de aproximadamente 420 mg cada cuatro semanas (Q4W); (18) al menos una cantidad de aproximadamente 1000 mg cada cuatro semanas (Q4W); (19) al menos una cantidad de aproximadamente 2000 mg cada cuatro semanas (Q4W); y (20) al menos una cantidad de aproximadamente 3000 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 15 % en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 20 %. En algunas realizaciones, el

nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 25 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 30 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 35 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 40 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 45 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 65 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 70 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 75 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 80 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 85 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 90 %.

En algunos aspectos, la invención comprende un método para reducir los valores de PCSK9 en un paciente, el cual método comprende administrarle a un paciente que lo necesite una dosis de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 y en donde la dosis del anticuerpo anti-PCSK9 se administra en un plan seleccionado del grupo que consiste en: (1) al menos aproximadamente 14 mg cada semana (QW); (2) al menos una cantidad de aproximadamente 35 mg cada semana (QW); (3) al menos una cantidad de aproximadamente 45 mg cada semana (QW); (4) al menos una cantidad de aproximadamente 70 mg cada dos semanas (Q2W); (5) al menos una cantidad de aproximadamente 105 mg cada dos semanas (Q2W); (6) al menos una cantidad de aproximadamente 140 mg cada dos semanas (Q2W); (7) al menos una cantidad de aproximadamente 150 mg cada dos semanas (Q2W); (8) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada dos semanas (Q2W); (9) al menos una cantidad de aproximadamente 150 mg cada cuatro semanas (Q4W); (10) al menos una cantidad de aproximadamente 160 mg cada cuatro semanas (Q4W); (11) al menos una cantidad de aproximadamente 170 mg cada cuatro semanas (Q4W); (12) al menos una cantidad de aproximadamente 180 mg cada cuatro semanas (Q4W); (13) al menos una cantidad de aproximadamente 190 mg cada cuatro semanas (Q4W); (14) al menos una cantidad de aproximadamente 200 mg cada cuatro semanas (Q4W); (15) al menos una cantidad de

aproximadamente 280 mg cada cuatro semanas (Q4W); (16) al menos una cantidad de aproximadamente 350 mg cada cuatro semanas (Q4W); (17) al menos una cantidad de aproximadamente 420 mg cada cuatro semanas (Q4W); (18) al menos una cantidad de aproximadamente 1000 mg cada cuatro semanas (Q4W); (19) al menos una cantidad de aproximadamente 2000 mg cada cuatro semanas (Q4W); y (20) al menos una cantidad de aproximadamente 3000 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, el valor de PCSK9 en suero se reduce en al menos aproximadamente el 60 % en comparación con un valor predosis de PCSK9 en suero. En algunas realizaciones, el valor de PCSK9 en suero se reduce en al menos aproximadamente el 65 %. En algunas realizaciones, el valor de PCSK9 en suero se reduce en al menos aproximadamente el 70 %. En algunas realizaciones, el valor de PCSK9 en suero se reduce en al menos aproximadamente el 75 %. En algunas realizaciones, el valor de PCSK9 en suero se reduce en al menos aproximadamente el 80 %. En algunas realizaciones, el valor de PCSK9 en suero se reduce en al menos aproximadamente el 85 %. En algunas realizaciones, el valor de PCSK9 en suero se reduce en al menos aproximadamente el 90 %.

En algunos aspectos, la invención comprende un método para reducir el nivel de colesterol total en un paciente, el cual método comprende administrarle a un paciente que lo necesite una dosis de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 y en donde la dosis del anticuerpo anti-PCSK9 se administra en un plan seleccionado del grupo que consiste en: (1) al menos aproximadamente 14 mg cada semana (QW); (2) al menos una cantidad de aproximadamente 35 mg cada semana (QW); (3) al menos una cantidad de aproximadamente 45 mg cada semana (QW); (4) al menos una cantidad de aproximadamente 70 mg cada dos semanas (Q2W); (5) al menos una cantidad de aproximadamente 105 mg cada dos semanas (Q2W); (6) al menos una cantidad de aproximadamente 140 mg cada dos semanas (Q2W); (7) al menos una cantidad de aproximadamente 150 mg cada dos semanas (Q2W); (8) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada dos semanas (Q2W); (9) al menos una cantidad de aproximadamente 150 mg cada cuatro semanas (Q4W); (10) al menos una cantidad de aproximadamente 160 mg cada cuatro semanas (Q4W); (11) al menos una cantidad de aproximadamente 170 mg cada cuatro semanas (Q4W); (12) al menos una cantidad de aproximadamente 180 mg cada cuatro semanas (Q4W); (13) al menos una cantidad de aproximadamente 190 mg cada cuatro semanas (Q4W); (14) al menos una cantidad de aproximadamente 200 mg cada cuatro semanas (Q4W); (15) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada cuatro semanas (Q4W); (16) al menos una cantidad de aproximadamente 350 mg cada cuatro semanas (Q4W); (17) al menos una cantidad de

aproximadamente 420 mg cada cuatro semanas (Q4W); (18) al menos una cantidad de aproximadamente 1000 mg cada cuatro semanas (Q4W); (19) al menos una cantidad de aproximadamente 2000 mg cada cuatro semanas (Q4W); y (20) al menos una cantidad de aproximadamente 3000 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 20 % en comparación con un nivel predosis de colesterol total. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 25 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 30 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 35 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 40 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 45 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 60 %.

En algunos aspectos, la invención comprende un método para reducir el nivel de colesterol no-HDL en un paciente, el cual método comprende administrarle a un paciente que lo necesite una dosis de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 y en donde la dosis del anticuerpo anti-PCSK9 se administra en un plan seleccionado del grupo que consiste en: (1) al menos aproximadamente 14 mg cada semana (QW); (2) al menos una cantidad de aproximadamente 35 mg cada semana (QW); (3) al menos una cantidad de aproximadamente 45 mg cada semana (QW); (4) al menos una cantidad de aproximadamente 70 mg cada dos semanas (Q2W); (5) al menos una cantidad de aproximadamente 105 mg cada dos semanas (Q2W); (6) al menos una cantidad de aproximadamente 140 mg cada dos semanas (Q2W); (7) al menos una cantidad de aproximadamente 150 mg cada dos semanas (Q2W); (8) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada dos semanas (Q2W); (9) al menos una cantidad de aproximadamente 150 mg cada cuatro semanas (Q4W); (10) al menos una cantidad de aproximadamente 160 mg cada cuatro semanas (Q4W); (11) al menos una cantidad de aproximadamente 170 mg cada cuatro semanas (Q4W); (12) al menos una cantidad de aproximadamente 180 mg cada cuatro semanas (Q4W); (13) al menos una cantidad de aproximadamente 190 mg cada cuatro semanas (Q4W); (14) al menos una cantidad de aproximadamente 200 mg cada cuatro semanas (Q4W); (15) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada cuatro semanas (Q4W); (16) al menos una cantidad de aproximadamente 350 mg cada cuatro semanas (Q4W); (17) al menos una cantidad de

aproximadamente 420 mg cada cuatro semanas (Q4W); (18) al menos una cantidad de aproximadamente 1000 mg cada cuatro semanas (Q4W); (19) al menos una cantidad de aproximadamente 2000 mg cada cuatro semanas (Q4W); y (20) al menos una cantidad de aproximadamente 3000 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 30 % en comparación con un nivel predosis de colesterol no-HDL. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 35 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 40 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 45 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 65 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 70 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 75 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 80 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 85 %.

En algunos aspectos, la invención comprende un método para reducir los niveles de ApoB en un paciente, el cual método comprende administrarle a un paciente que lo necesite una dosis de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 y en donde la dosis del anticuerpo anti-PCSK9 se administra en un plan seleccionado del grupo que consiste en: (1) al menos aproximadamente 14 mg cada semana (QW); (2) al menos una cantidad de aproximadamente 35 mg cada semana (QW); (3) al menos una cantidad de aproximadamente 45 mg cada semana (QW); (4) al menos una cantidad de aproximadamente 70 mg cada dos semanas (Q2W); (5) al menos una cantidad de aproximadamente 105 mg cada dos semanas (Q2W); (6) al menos una cantidad de aproximadamente 140 mg cada dos semanas (Q2W); (7) al menos una cantidad de aproximadamente 150 mg cada dos semanas (Q2W); (8) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada dos semanas (Q2W); (9) al menos una cantidad de aproximadamente 150 mg cada cuatro semanas (Q4W); (10) al menos una cantidad de aproximadamente 160 mg cada cuatro semanas (Q4W); (11) al menos una cantidad de aproximadamente 170 mg cada cuatro semanas (Q4W); (12) al menos una cantidad de aproximadamente 180 mg cada cuatro semanas (Q4W); (13) al menos una cantidad de aproximadamente 190 mg cada cuatro semanas (Q4W); (14) al menos una cantidad de

aproximadamente 200 mg cada cuatro semanas (Q4W); (15) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada cuatro semanas (Q4W); (16) al menos una cantidad de aproximadamente 350 mg cada cuatro semanas (Q4W); (17) al menos una cantidad de aproximadamente 420 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 20 % en comparación con un nivel predosis de ApoB. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 25 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 30 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 35 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 40 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 45 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 65 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 70 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 75 %.

En algunos aspectos, la invención comprende un método para reducir los niveles de lipoproteína A ("Lp(a)") en un paciente, el cual método comprende administrarle a un paciente que lo necesite una dosis de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 y en donde la dosis del anticuerpo anti-PCSK9 se administra en un plan seleccionado del grupo que consiste en: (1) al menos aproximadamente 14 mg cada semana (QW); (2) al menos una cantidad de aproximadamente 35 mg cada semana (QW); (3) al menos una cantidad de aproximadamente 45 mg cada semana (QW); (4) al menos una cantidad de aproximadamente 70 mg cada dos semanas (Q2W); (5) al menos una cantidad de aproximadamente 105 mg cada dos semanas (Q2W); (6) al menos una cantidad de aproximadamente 140 mg cada dos semanas (Q2W); (7) al menos una cantidad de aproximadamente 150 mg cada dos semanas (Q2W); (8) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada dos semanas (Q2W); (9) al menos una cantidad de aproximadamente 150 mg cada cuatro semanas (Q4W); (10) al menos una cantidad de aproximadamente 160 mg cada cuatro semanas (Q4W); (11) al menos una cantidad de aproximadamente 170 mg cada cuatro semanas (Q4W); (12) al menos una cantidad de aproximadamente 180 mg cada cuatro semanas (Q4W); (13) al menos una cantidad de aproximadamente 190 mg cada cuatro semanas (Q4W); (14) al menos una cantidad de aproximadamente 200 mg cada cuatro semanas (Q4W); (15) al menos una

- cantidad de aproximadamente 280 mg cada cuatro semanas (Q4W); (16) al menos una cantidad de aproximadamente 350 mg cada cuatro semanas (Q4W); (17) al menos una cantidad de aproximadamente 420 mg cada cuatro semanas (Q4W); (18) al menos una cantidad de aproximadamente 1000 mg cada cuatro semanas (Q4W); (19) al menos una
- 5 cantidad de aproximadamente 2000 mg cada cuatro semanas (Q4W); y (20) al menos una cantidad de aproximadamente 3000 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, el nivel de Lp(a) se reduce en al menos aproximadamente el 10 % en comparación con un nivel predosis de Lp(a). En algunas realizaciones, el nivel de Lp(a) se reduce en al menos aproximadamente el 15 %. En algunas realizaciones, el nivel de Lp(a) se reduce en al menos
- 10 aproximadamente el 20 %. En algunas realizaciones, el nivel de Lp(a) se reduce en al menos aproximadamente el 25 %. En algunas realizaciones, el nivel de Lp(a) se reduce en al menos aproximadamente el 30 %. En algunas realizaciones, el nivel de Lp(a) se reduce en al menos aproximadamente el 35 %. En algunas realizaciones, el nivel de Lp(a) se reduce en al menos aproximadamente el 40 %. En algunas realizaciones, el nivel de Lp(a) se reduce en al menos
- 15 aproximadamente el 45 %. En algunas realizaciones, el nivel de Lp(a) se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En algunas realizaciones, el nivel de Lp(a) se reduce en al menos aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de Lp(a) se reduce en al menos aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones, el nivel de Lp(a) se reduce en al menos aproximadamente el 65 %.
- 20 En algunos aspectos, la invención comprende un método para tratar o prevenir un trastorno relacionado con el colesterol en un paciente, el cual método comprende administrarle a un paciente que lo necesite una dosis de entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 3000 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 descrito en el presente. En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 70 mg de al
- 25 menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez por semana (QW). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 14 mg y aproximadamente 45 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez por semana. En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 14 mg y aproximadamente 35 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez por semana. En algunas realizaciones, la dosis es
- 30 entre aproximadamente 70 mg y aproximadamente 420 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada dos semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 70 mg y aproximadamente 350 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada dos semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 105 mg y aproximadamente 350 mg de al menos un anticuerpo anti-

PCSK9 administrado una vez cada dos semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 140 mg y aproximadamente 280 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada dos semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 150 mg y aproximadamente 280 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada dos semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 150 mg y aproximadamente 200 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada dos semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 150 mg y aproximadamente 480 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 150 mg y aproximadamente 200 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 480 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 250 mg y aproximadamente 480 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 280 mg y aproximadamente 420 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, la dosis es entre aproximadamente 350 mg y aproximadamente 420 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada cuatro semanas. En algunas realizaciones, la dosis es aproximadamente 1000 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, la dosis es aproximadamente 2000 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, la dosis es aproximadamente 3000 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 15 % en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 20 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 25 % cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 30 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 35 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 40 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 45 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol

LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 65 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 70 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 75 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 80 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 85 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 90 %. En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con el colesterol es hipercolesterolemia familiar heterocigótica, hipercolesterolemia familiar homocigótica, hipercolesterolemia no familiar, hiperlipidemia o dislipidemia.

En algunos aspectos, la invención comprende un método para tratar o prevenir un trastorno relacionado con el colesterol en un paciente, el cual método comprende administrar a un paciente que lo necesite una dosis de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 y en donde la dosis del anticuerpo anti-PCSK9 se administra en un plan seleccionado del grupo que consiste en: (1) al menos aproximadamente 14 mg cada semana (QW); (2) al menos una cantidad de aproximadamente 35 mg cada semana (QW); (3) al menos una cantidad de aproximadamente 45 mg cada semana (QW); (4) al menos una cantidad de aproximadamente 70 mg cada dos semanas (Q2W); (5) al menos una cantidad de aproximadamente 105 mg cada dos semanas (Q2W); (6) al menos una cantidad de aproximadamente 140 mg cada dos semanas (Q2W); (7) al menos una cantidad de aproximadamente 150 mg cada dos semanas (Q2W); (8) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada dos semanas (Q2W); (9) al menos una cantidad de aproximadamente 150 mg cada cuatro semanas (Q4W); (10) al menos una cantidad de aproximadamente 160 mg cada cuatro semanas (Q4W); (11) al menos una cantidad de aproximadamente 170 mg cada cuatro semanas (Q4W); (12) al menos una cantidad de aproximadamente 180 mg cada cuatro semanas (Q4W); (13) al menos una cantidad de aproximadamente 190 mg cada cuatro semanas (Q4W); (14) al menos una cantidad de aproximadamente 200 mg cada cuatro semanas (Q4W); (15) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada cuatro semanas (Q4W); (16) al menos una cantidad de aproximadamente 350 mg cada cuatro semanas (Q4W); (17) al menos una cantidad de aproximadamente 420 mg cada cuatro semanas (Q4W); (18) al menos una cantidad de aproximadamente 1000 mg cada cuatro semanas (Q4W); (19) al menos una cantidad de aproximadamente 2000 mg cada cuatro semanas (Q4W); y (20) al menos una cantidad de aproximadamente 3000 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones,

el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 15 % en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 20 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 25 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 30 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 35 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 40 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 45 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 65 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 70 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 75 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 80 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 85 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 90 %.

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

En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con el colesterol es hipercolesterolemia familiar heterocigótica, hipercolesterolemia familiar homocigótica, hipercolesterolemia no familiar, hiperlipidemia o dislipidemia.

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

Otras realizaciones de la presente invención se percibirán fácilmente a partir de la divulgación proporcionada en el presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1A presenta una secuencia de aminoácidos de la forma madura de la PCSK9 con el prodominio subrayado.

Las figuras 1B₁-1B₄ presentan secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de PCSK9 con el prodominio subrayado y la secuencia señal en negrita.

Las figuras 2A-2D son tablas de comparación de secuencias de diversas cadenas ligeras de diversas proteínas de unión a antígenos. La figura 2C continúa la secuencia iniciada en la figura 2A. La figura 2D continúa la secuencia iniciada en la figura 2B.

Las figuras 3A-3D son tablas de comparación de secuencias de diversas cadenas pesadas de diversas proteínas de unión a antígenos. La figura 3C continúa la secuencia iniciada en la figura 3A. La figura 3D continúa la secuencia iniciada en la figura 3B.

Las figuras 3E-3JJ presentan las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos para los dominios variables de algunas realizaciones de las proteínas de unión a antígenos.

La figura 3KK presenta las secuencias de aminoácidos para diversos dominios constantes.

Las figuras 3LL-3BBB presentan las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos para los dominios variables de algunas realizaciones de las proteínas de unión a antígenos.

Las figuras 3CCC-3JJJ son tablas de comparación de secuencias de diversas cadenas pesadas y ligeras de algunas realizaciones de las proteínas de unión a antígenos.

La figura 4A es una curva de unión de una proteína de unión a antígenos con la PCSK9 humana.

La figura 4B es una curva de unión de una proteína de unión a antígenos con la PCSK9 humana.

La figura 4C es una curva de unión de una proteína de unión a antígenos con la PCSK9 de cynomolgus.

La figura 4D es una curva de unión de una proteína de unión a antígenos con la PCSK9 de cynomolgus.

La figura 4E es una curva de unión de una proteína de unión a antígenos con la PCSK9 de ratón.

La figura 4F es una curva de unión de una proteína de unión a antígenos con la PCSK9 de ratón.

La figura 5A presenta los resultados de un experimento SDS PAGE que involucra PCSK9 y diversas proteínas de unión a antígenos que demuestran la pureza relativa y la concentración de las proteínas.

Las figuras 5B y 5C presentan gráficas de ensayos de equilibrio de solución de Biacore para 21B12.

La figura 5D presenta una gráfica de la cinética de un ensayo de captura de Biacore.

La figura 5E presenta una gráfica de barras que presenta los resultados de unión para tres ABP.

La figura 6A es una curva de inhibición de una proteína de unión a antígenos 31H4 IgG2 para PCSK9 en una PCSK9 *in vitro*: ensayo de unión al LDLR.

5 La figura 6B es una curva de inhibición de una proteína de unión a antígenos 31H4 IgG4 para PCSK9 en una PCSK9 *in vitro*: ensayo de unión al LDLR.

La figura 6C es una curva de inhibición de una proteína de unión a antígenos 21B12 IgG2 para PCSK9 en una PCSK9 *in vitro*: ensayo de unión al LDLR.

10 La figura 6D es una curva de inhibición de una proteína de unión a antígenos 21B12 IgG4 para PCSK9 en una PCSK9 *in vitro*: ensayo de unión al LDLR.

La figura 7A es una curva de inhibición de una proteína de unión a antígenos 31H4 IgG2 en el ensayo de absorción del LDL celular que muestra el efecto de la ABP para reducir los efectos de bloqueo de absorción del LDL de la PCSK9.

15 La figura 7B es una curva de inhibición de una proteína de unión a antígenos 31H4 IgG4 en el ensayo de absorción del LDL celular que muestra el efecto de la ABP para reducir los efectos de bloqueo de absorción del LDL de la PCSK9.

La figura 7C es una curva de inhibición de una proteína de unión a antígenos 21B12 IgG2 en el ensayo de absorción del LDL celular que muestra el efecto de la ABP para reducir los efectos de bloqueo de absorción del LDL de la PCSK9.

20 La figura 7D es una curva de inhibición de una proteína de unión a antígenos 21B12 IgG4 en el ensayo de absorción del LDL celular que muestra el efecto de la ABP para reducir los efectos de bloqueo de absorción del LDL de la PCSK9.

25 La figura 8A es una gráfica que presenta la capacidad de reducción de colesterol en suero en ratones de ABP 31H4, cambios con relación a los ratones tratados con IgG de control (* $p < 0,01$).

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

La figura 8C es una gráfica que presenta el efecto de ABP 31H4 en los niveles de colesterol HDL en ratones C57Bl/6 (* $p < 0,01$).

30 La figura 8D es una gráfica que presenta el efecto de ABP 31H4 en los niveles de colesterol HDL en ratones C57Bl/6 (# $p < 0,05$).

La figura 9 presenta un análisis western blot de la capacidad de ABP 31H4 de mejorar la cantidad de proteína en el LDLR del hígado presente después de diversos puntos de tiempo.

La figura 10A es una gráfica que presenta la capacidad de una proteína de unión a

antígenos 31H4 de disminuir el colesterol en suero total en ratones naturales, relativo.

La figura 10B es una gráfica que presenta la capacidad de una proteína de unión a antígenos 31H4 de disminuir HDL en ratones naturales.

La figura 10C es una gráfica que presenta la capacidad de reducción de colesterol en suero de diversas proteínas de unión a antígenos 31H4 y 16F12.

La figura 11A presenta un protocolo de inyección para evaluar la duración y capacidad de las proteínas de unión a antígenos de disminuir el colesterol en suero.

La figura 11B es una gráfica que presenta los resultados del protocolo en la figura 11A.

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

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

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

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

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

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

La figura 13A presenta las diversas secuencias de aminoácidos de cadena ligera de diversas ABP para PCSK9. Los puntos (.) indican que no hay aminoácidos.

La figura 13B presenta un cladograma de cadenas ligeras para diversas ABP para PCSK9.

La figura 13C presenta las diversas secuencias de aminoácidos de cadena pesada de diversas ABP para PCSK9. Los puntos (.) indican que no hay aminoácidos.

La figura 13D presenta un dendrograma de cadenas ligeras para diversas ABP para PCSK9.

La figura 13E presenta una comparación de CDR ligera y pesada y la designación de los grupos de los cuales obtener consenso.

La figura 13F presenta las secuencias de consenso para los Grupos 1 y 2.

La figura 13G presenta las secuencias de consenso para los Grupos 3 y 4.

La figura 13H presenta las secuencias de consenso para los Grupos 1 y 2. Los puntos (.) indicaron los residuos idénticos.

La figura 13I presenta las secuencias de consenso para el Grupo 2. Los puntos (.) indicaron los residuos idénticos.

5 La figura 13J presenta las secuencias de consenso para los Grupos 3 y 4. Los puntos (.) indicaron los residuos idénticos.

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

10 La figura 15 es una gráfica que muestra la reducción de los niveles de LDL-c en pacientes con dosis bajas a moderas y altas de estatinas que recibieron dosis múltiples de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12).

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

15 La figura 17 es una gráfica de barras que muestra la reducción de los niveles de lipoproteína a ("Lp(a)") en pacientes con dosis bajas a moderas y altas de estatinas que recibieron dosis múltiples de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12).

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

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

25 La figura 20 es una gráfica que muestra la reducción de los niveles de colesterol total en pacientes que tienen hipercolesterolemia familiar heterocigótica ("HeFH") que recibieron dosis múltiples de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12).

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

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

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

La figura 24A es una gráfica que muestra los datos globales referidos a la reducción de LDL-C en pacientes de cuatro estudios descritos en los ejemplos 22-25 que recibieron diversas dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12) cada dos semanas (Q2W) durante un período de 12 semanas.

5 La figura 24B es una gráfica que muestra los datos globales referidos a la reducción de LDL-C en pacientes de cuatro estudios descritos en los ejemplos 22-25 que recibieron diversas dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12) cada cuatro semanas (Q4W) durante un período de 12 semanas.

10 La figura 25A es una gráfica de barras que muestra los datos globales referidos a la reducción de Lp(a) en pacientes de cuatro estudios descritos en los ejemplos 22-25 que recibieron diversas dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12), ya sea cada dos semanas (Q2W) o cada cuatro semanas (Q4W) durante un período de 12 semanas.

15 La figura 25B es una gráfica de barras que muestra los datos globales referidos a la reducción de HDL-C en pacientes de cuatro estudios descritos en los ejemplos 22-25 que recibieron diversas dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12), ya sea cada dos semanas (Q2W) o cada cuatro semanas (Q4W) durante un período de 12 semanas.

20 La figura 25C es una gráfica de barras que muestra los datos globales referidos a la reducción de triglicéridos en pacientes de cuatro estudios descritos en los ejemplos 22-25 que recibieron diversas dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12), ya sea cada dos semanas (Q2W) o cada cuatro semanas (Q4W) durante un período de 12 semanas.

La figura 25D es una gráfica de barras que muestra los datos globales referidos a la reducción de VLDL-C en pacientes de cuatro estudios descritos en los ejemplos 22-25 que recibieron diversas dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12), ya sea cada dos semanas (Q2W) o cada cuatro semanas (Q4W) durante un período de 12 semanas.

25 La figura 26 es una gráfica de barras que muestra la viscosidad de las formulaciones del anticuerpo anti-PCSK9 (21B12) que contienen diversos estabilizadores/excipientes.

La figura 27 es una gráfica que muestra que el estabilizador/excipiente, prolina, tiene la capacidad de reducir la viscosidad de la formulaciones del anticuerpo anti-PCSK9 (21B12) que tienen altas concentraciones de proteínas.

30 La figura 28A es una gráfica que muestra la viscosidad de diversas concentraciones del anticuerpo anti-PCSK9, 21B12, en una formulación que comprende 10 mM de acetato de sodio y el 9 % de sucrosa, pH 5,2, a 25 °C y 40 °C.

La figura 28B es una gráfica que muestra la viscosidad de diversas concentraciones del anticuerpo anti-PCSK9, 21B12, en una formulación que comprende 10 mM de acetato de

sodio y el 9 % de sucrosa, pH 5,2, a 25 °C y 40 °C, en comparación con una formulación que comprende 10 mM de acetato de sodio, 125 mM de arginina y el 3 % de sucrosa, pH 5,0, a 25 °C y 40 °C.

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

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

15 La figura 29A es una gráfica de barras que muestra el número de partículas de 10 µm en diversas formulaciones del anticuerpo anti-PCSK9 (es decir, 21B12) durante un periodo de 6 meses.

La figura 29B es una gráfica de barras que muestra el número de partículas de 25 µm en diversas formulaciones del anticuerpo anti-PCSK9 (es decir, 21B12) durante un periodo de 6 meses.

20 La figura 30A es una gráfica de barras que muestra el número de partículas de 10 µm en diversas formulaciones del anticuerpo anti-PCSK9 (es decir, 11F1) durante un periodo de 4 meses.

La figura 30B es una gráfica de barras que muestra el número de partículas de 25 µm en diversas formulaciones del anticuerpo anti-PCSK9 (es decir, 11F1) durante un periodo de 4 meses.

25 La figura 31 es una gráfica que ilustra la especificidad de unión de 11F1 en un ensayo de competición con PCSKP, PCSK2, PCSK1 PCSK7 y furina con OD₄₅₀ representada en el eje vertical y la concentración de PCSK9 (ug/ml) representada en el eje horizontal.

30 La figura 32 es una gráfica que muestra la curva de respuesta a la dosis para la inhibición de LDLR: unión de D374Y PCSK9 por 11F1 en un ensayo de competición con OD₄₅₀ representada en el eje vertical y Log [11F1] (pM) representado en el eje horizontal.

La figura 33 es una gráfica que presenta la curva de respuesta a la dosis para la inhibición de LDLR: unión de WT PCSK9 por 11F1 en un ensayo de competición con OD₄₅₀ representada en el eje vertical y Log [11f1] (pM) representado en el eje horizontal.

La figura 34 es una gráfica que presenta la curva de respuesta a la dosis para la

capacidad de 11F1 de bloquear la reducción mediada por D374Y PCSK9 humana de la absorción del LDL en células HepG2 con las unidades de fluorescencia relativa ($\times 10^4$) representadas en el eje vertical y Log [11F1] (nM) representado en el eje horizontal.

5 La figura 35 es una gráfica que presenta la curva de respuesta a la dosis para la capacidad de 11F1 de bloquear la reducción mediada por WT PCSK9 humana de la absorción del LDL en células HepG2 con las unidades de fluorescencia relativa ($\times 10^4$) representadas en el eje vertical y Log [11F1] (nM) representado en el eje horizontal.

10 La figura 36 es una gráfica de barras que presenta el efecto de 11F1 y 8A3 en el colesterol no-HDL en suero en ratones que expresaron PCSK9 humana por AAV con la concentración de no-HDL-C en suero (mg/ml) en el eje vertical y el tiempo después de la inyección (días) representado en el eje horizontal.

15 La figura 37 es una gráfica de barras que presenta el efecto de 11F1 y 8A3 en colesterol en suero total en ratones que expresaron PCSK9 humana por AAV con el colesterol en suero total (mg/ml) en el eje vertical y el tiempo después de la inyección (días) representado en el eje horizontal.

La figura 38 es una gráfica de barras que presenta el efecto de 11F1 y 8A3 en colesterol HDL en suero (HDL-C) en ratones que expresaron PCSK9 humana por AAV con el HDL-C (mg/ml) en el eje vertical y el tiempo después de la inyección (días) representado en el eje horizontal.

20 La figura 39 es una gráfica que presenta los perfiles de concentración de los anticuerpos IgG2, 8A3 y 11F1 en ratones que expresaron PCSK9 humana por AAV con la concentración de anticuerpo en suero (ng/mL) representada en el eje vertical y el tiempo después de la inyección en días representado en el eje horizontal.

25 La figura 40 es una tabla que resume los parámetros PK para IgG2, 11F1 y 8A3 en ratones que expresaron PCSK9 humana por AAV.

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

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

La figura 43 es una gráfica que presenta el efecto de una única administración

subcutánea de un anticuerpo anti-KLH (control), 21B12, 8A3 y 11F1 en colesterol HDL en suero en monos cynomolgus con el HDL-C (mg/dl) representado en el eje vertical y el tiempo después de la administración en días en el eje horizontal.

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

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

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

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

20 La figura 48A presenta una comparación de secuencias de aminoácidos de cadena ligera de 8A1, 8A3 y 11F1, así como una secuencia de consenso derivada de la comparación. Las secuencias de CDR están subrayadas.

La figura 48B presenta una comparación de secuencias de aminoácidos de cadena pesada de 8A1, 8A3 y 11F1, así como una secuencia de consenso derivada de la comparación. Las secuencias de CDR están subrayadas.

25 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE DETERMINADAS REALIZACIONES EJEMPLARES**

30 En el presente se divulgan proteínas de unión a antígenos (por ejemplo anticuerpos y fragmentos de unión funcionales de estos) que se unen a PCSK9. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos se unen a PCSK9 y evitan que la PCSK9 funcione de diversas maneras. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos bloquean o reducen la capacidad de la PCSK9 de interactuar con otras sustancias. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos se une a PCSK9 de una manera que evita o reduce la posibilidad de que la PCSK9 se una al LDLR. En otras realizaciones, las proteínas de unión a antígenos se unen a la PCSK9 pero no bloquean la capacidad de la PCSK9 de interactuar con el LDLR. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos son

anticuerpos monoclonales humanos.

Como apreciarán los entendidos en la técnica, a la luz de la presente divulgación, alterar las interacciones entre PCSK9 y LDLR puede aumentar la cantidad de LDLR disponible para la unión a LDL que, a su vez, disminuye la cantidad de LDL en suero en un sujeto, lo que produce una reducción en el nivel de colesterol en suero del sujeto. Por lo tanto, se pueden utilizar proteínas de unión a antígenos que se unen a la PCSK9 en diversos métodos y formulaciones para tratar sujetos con niveles de colesterol en suero elevados, en riesgo de niveles de colesterol en suero elevados o que se pueden beneficiar de una reducción en sus niveles de colesterol en suero. Por lo tanto, en el presente también se describen diversos métodos y técnicas para reducir, mantener o prevenir un aumento en el colesterol en suero. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos permite la unión entre PCSK9 y LDLR, pero la proteína de unión a antígenos evita o reduce la actividad adversa de PCSK9 en LDLR. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos evita o reduce la unión de PCSK9 a LDLR.

Por conveniencia, las siguientes secciones generalmente describen los diversos significados de los términos utilizados en el presente. Luego de este análisis, se plantean aspectos generales con respecto a las proteínas de unión a antígenos, seguido de ejemplos específicos que demuestran las propiedades de diversas realizaciones de las proteínas de unión a antígenos y cómo estas se pueden emplear.

20

Definiciones y realizaciones

Se entenderá que la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada son ejemplares y únicamente con fines explicativos y que no son restrictivas de la invención tal como se reivindica. En la presente solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. La presente solicitud, el uso de "o" significa "y/o", a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, por ejemplo "incluye" e "incluido", no es limitante. Además, los términos como "elemento" o "componente" abarcan los elementos y componentes que comprenden una unidad y los elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se indique específicamente lo contrario. Además, el uso del término "porción" puede incluir parte de una fracción o la fracción entera.

30

Los encabezados de sección utilizados aquí tienen fines organizativos únicamente y no deben ser interpretados como limitantes de la materia que se describe. Todos los documentos, o partes de documentos, citados en la presente solicitud, incluso, entre otros, patentes,

solicitudes de patentes, artículos, libros y tratados, se incorporan expresamente al presente por referencia en su totalidad para cualquier fin. Se entenderá que los siguientes términos, tal como se utilizan de acuerdo con la presente divulgación, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

- 5 El término "proteína convertasa subtilisina kexina tipo 9" o "PCSK9" se refiere a un polipéptido como se establece en SEC. ID. N.º: 1 y/o 3 o fragmentos de este, así como polipéptidos relacionados que incluyen, entre otros, variantes alélicas, variantes de corte, variantes de derivados, variantes de sustitución, variantes de eliminación y/o variantes de inserción que incluyen la adición de una metionina N-terminal, polipéptidos de fusión y
- 10 homólogos entre especies. En determinadas realizaciones, un polipéptido PCSK9 incluye residuos del terminal, por ejemplo, entre otros, residuos de una secuencia líder, residuos diana, residuos de metionina del extremo amino terminal, residuos de lisina, residuos de etiqueta y/o residuos de una proteína de fusión. "PCSK9" también se ha denominado FH3, NARC1, HCHOLA3, proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 y convertasa regulada por apoptosis neuronal 1. El gen PCSK9 codifica una proteína proproteína convertasa que pertenece a la
- 15 subfamilia proteinasa K de la familia subtilasa secretora. El término "PCSK9" indica la proproteína y el producto generado luego de la autocatálisis de la proproteína. Cuando solamente se menciona el producto autocatalizado (por ejemplo para una proteína de unión a antígenos que se une selectivamente a la PCSK9 escindida), la proteína se puede denominar
- 20 PCSK9 "madura", "escindida", "procesada" o "activa". Cuando solamente se menciona la forma inactiva, la proteína se puede denominar forma de PCSK9 "inactiva", "proforma" o "son procesar". El término PCSK9, según se emplea aquí, también incluye alelos naturales, por ejemplo las mutaciones D374Y, S127R y F216L. El término PCSK9 también comprende moléculas de PCSK9 que incorporan modificaciones postraduccionales de la secuencia de
- 25 aminoácidos de PCSK9, por ejemplo las secuencias de PCSK9 que se han glicosilado, PEGilado, las secuencias de PCSK9 de las cuales se ha escindido su secuencia señal, la secuencia de PCSK9 de la cual se ha escindido su prodominio del dominio catalítico pero no se ha separado del dominio catalítico (p. ej., las figuras 1A y 1B).

- 30 El término "actividad de PCSK9" incluye cualquier efecto biológico de PCSK9. En determinadas realizaciones, la actividad de PCSK9 incluye la capacidad de PCSK9 de interactuar o unirse a un sustrato o receptor. En algunas realizaciones, la actividad de PCSK9 se representa por la capacidad de PCSK9 de unirse a un receptor de LDL (LDLR). En algunas realizaciones, PCSK9 se une y cataliza una reacción que involucra a LDLR. En algunas realizaciones, la actividad de PCSK9 incluye la capacidad de PCSK9 de alterar (p. ej., reducir)

la disponibilidad de LDLR. En algunas realizaciones, la actividad de PCSK9 incluye la capacidad de PCSK9 de aumentar la cantidad de LDL en un sujeto. En algunas realizaciones, la actividad de PCSK9 incluye la capacidad de PCSK9 de disminuir la cantidad de LDLR que está disponible para unirse a LDL. En algunas realizaciones, la "actividad de PCSK9" incluye cualquier actividad biológica que provenga de la señalización de PCSK9. Las actividades ejemplares incluyen, entre otros, la unión de PCSK9 a LDLR, la actividad enzimática de PCSK9 que escinde LDLR u otras proteínas, la unión de PCSK9 a las proteínas diferentes de LDLR que facilitan la acción de PCSK9, la alteración de PCSK9 a la secreción de APOB (Sun X-M y col., "Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolemia, Human Molecular Genetics 14: 1161-1169, 2005 y Ouguerram K y col., "Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9, Arterioscler thromb Vasc Biol. 24: 1448-1453, 2004), la función de PCSK9 en la regeneración del hígado y la diferenciación de las células neuronales (Seidah NG y col., "The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation" PNAS 100: 928-933, 2003) y la función de PCSK9 en el metabolismo de la glucosa hepática (Costet y col., "Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c" J. Biol. Chem. 281(10): 6211-18, 2006).

El término "hipercolesterolemia", según se emplea aquí, se refiere a una afección en la cual los niveles de colesterol se elevan por encima de un nivel deseado. En algunas realizaciones, esto indica que los niveles de colesterol en suero están elevados. En algunas realizaciones, el nivel deseado considera diversos "factores de riesgo" conocidos para los entendidos en la técnica (y se describen o mencionan aquí).

El término "polinucleótido" o "ácido nucleico" incluye polímeros de nucleótidos de cadena única y de cadena doble. Los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cada tipo de nucleótido. Dichas modificaciones incluyen modificaciones de base, por ejemplo derivados de inosina y bromouridina, modificaciones de ribosa, por ejemplo 2',3'-didesoxirribosa y modificaciones de unión a internucleótidos, por ejemplo fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato y fosforoamidato.

El término "oligonucleótido" significa un polinucleótido que comprende 200 o menos nucleótidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos son de 10 a 60 bases de longitud. En otras realizaciones, los oligonucleótidos son de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser de cadena única o de cadena doble, p.

ej., para su uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido. Un oligonucleótido puede incluir una etiqueta, incluso un radiomarcador, una etiqueta fluorescente, un apteno o una etiqueta antigénica, para los ensayos de detección. Los oligonucleótidos se pueden utilizar, por ejemplo, como cebadores de PCR, cebadores de clonación o sondas de hibridación.

Una "molécula de ácido nucleico aislada" significa un ADN o ARN de origen genómico, ARNm, ADNc, o sintético o alguna combinación de estos que no está asociada con todo o una parte de un polinucleótido en la cual el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, o está unido a un polinucleótido al cual no está unido en la naturaleza. A los efectos de la presente divulgación, se entenderá que "una molécula de ácido nucleico que comprende" una secuencia de nucleótidos particular no abarca cromosomas intactos. Las moléculas de ácido nucleico aisladas "que comprenden" secuencias de ácidos nucleicos especificadas pueden incluir, además de las secuencias especificadas, secuencias codificantes para un máximo de diez, o incluso hasta veinte proteínas diferentes o partes de estas, o pueden incluir secuencias reguladoras unidas funcionalmente que controlan la expresión de la región codificante de las secuencias de ácidos nucleicos descritas, y/o pueden incluir secuencias de vectores.

A menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de cualquier secuencia de polinucleótidos de cadena única planteado en el presente es el extremo 5'; la dirección hacia la izquierda de las secuencias de polinucleótidos de cadena doble se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' de transcripciones de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción; las regiones de secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que la transcripción de ARN que son de 5' al extremo 5' de la transcripción de ARN se denominan "secuencias cadena arriba"; las regiones de secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que la transcripción de ARN que son de 3' al extremo 3' de la transcripción de ARN se denominan "secuencias cadena abajo".

El término "secuencia de control" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que puede afectar la expresión y procesamiento de las secuencias codificantes a las cuales se liga. La naturaleza de dichas secuencias de control puede depender del organismo huésped. En realizaciones específicas, las secuencias de control para procariotas puede incluir un promotor, un sitio de unión al ribosoma y una secuencia de terminación de transcripción. Por ejemplo, las secuencias de control para eucariotas puede incluir promotores que comprenden uno o diversos sitios de reconocimiento para los factores de transcripción, las secuencias potenciadoras de transcripción y la secuencia de terminación de transcripción. Las "secuencias de control" pueden incluir secuencias líder y/o secuencias parejas de fusión.

El término “vector” significa cualquier molécula o entidad (p. ej., ácido nucleico, plásmido, bacteriófago o virus) utilizada para transferir la información de codificación de la proteína en una célula huésped.

5 El término “vector de expresión” o “construcción de expresión” se refiere a un vector que es adecuado para la transformación de una célula huésped y contiene secuencias de ácidos nucleicos que conduce y/o controla (junto con la célula huésped) la expresión de una o más regiones codificantes heterólogas unidas de forma operativa al mismo. Una construcción de expresión puede incluir, entre otros, secuencias que afectan o controlan la transcripción, la traducción y, si hay intrones presentes, afectan el empalme de ARN de una región codificante
10 unida funcionalmente a la misma.

Según se emplea aquí, “unido funcionalmente” significa que los componentes a los cuales se aplica el término están en una relación que les permite llevar a cabo sus funciones inherentes en condiciones adecuadas. Por ejemplo, una secuencia de control en un vector que está “unida funcionalmente” a una secuencia codificante de la proteína se liga con este de modo
15 que se logra la expresión de la secuencia codificante de la proteína en condiciones compatibles con la actividad transcripcional de las secuencias de control.

El término “célula huésped” significa una célula que se ha transformado, o que puede ser transformada, con una secuencia de ácidos nucleicos y que, por lo tanto, expresa un gen de interés. El término incluye la progenie de la célula madre, ya sea si la progenie es idéntica en
20 morfología o en estructura genética o no a la célula madre original, siempre y cuando esté presente el gen de interés.

El término “transfección” significa la absorción de ADN extraño o exógeno por una célula y una célula se ha “transfectado” cuando el ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. En la técnica se conocen varias técnicas de transfección y se divulgan en el presente. Véase, p. ej., Graham y col., 1973, *Virology* 52: 456; Sambrook y col., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, mencionado anteriormente; Davis y col., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; Chu y col., 1981, *Gene* 13: 197. Dichas técnicas se pueden utilizar
25 para introducir una o más fracciones de ADN exógeno en células huésped adecuadas.

El término “transformación” se refiere a un cambio en las características genéticas de la célula y una célula se ha transformado cuando se ha modificado para contener un nuevo ADD o ARN. Por ejemplo, una célula se transforma cuando se modifica genéticamente desde su estado natural al introducir nuevo material genético mediante transfección, transducción u otras técnicas. Después de la transfección o transducción, el ADN transformante se puede recombinar con el de la célula al integrarse físicamente en un cromosoma de la célula, o se
30

puede mantener transitoriamente como un elemento episomal sin ser replicado, o se puede replicar independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha "transformado de forma estable" cuando el ADN transformante se replica con la división de la célula.

5 Los términos "polipéptido" o "proteína" significan una macromolécula que tiene la secuencia de aminoácidos de una proteína nativa, es decir, una proteína producida por una célula natural o no-recombinante; o se produce por una célula modificada genéticamente o recombinante y comprende moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa, o moléculas que tienen eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más
10 aminoácidos de la secuencia nativa. El término también incluye amino polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más aminoácidos son análogos químicos de un aminoácido natural y polímeros correspondientes. Los términos "polipéptido" y "proteína" abarcan específicamente proteínas de unión a antígenos PCSK9, anticuerpos o secuencias que tienen eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de una proteína de unión
15 a antígenos. El término "fragmento de polipéptido" se refiere a un polipéptido que tiene una eliminación del extremo amino terminal, una eliminación del extremo carboxilo terminal y/o una eliminación interna en comparación con la proteína nativa completa. Dichos fragmentos también pueden contener aminoácidos modificados en comparación con la proteína nativa. En determinadas realizaciones, los fragmentos son aproximadamente de cinco a 500 aminoácidos
20 de largo. Por ejemplo, los fragmentos pueden ser al menos de 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 aminoácidos de largo. Los fragmentos de polipéptido útiles incluyen fragmentos de anticuerpos inmunológicamente funcionales, incluso dominios de unión. En el caso de un anticuerpo de unión a PCSK9, los fragmentos útiles incluyen, entre otros, una región CDR, un dominio variable de una cadena pesada y/o ligera, una parte de una
25 cadena de anticuerpo o solamente su región variable que incluye dos CDR y similares.

El término "proteína aislada" referido significa que la proteína de un sujeto (1) está libre de al menos algunas proteínas diferentes con las cuales normalmente se encontraría, (2) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente, p. ej., de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos
30 aproximadamente el 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los cuales está asociada en la naturaleza, (5) está asociada funcionalmente (por interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el cual no está asociada en la naturaleza, o (6) no aparece en la naturaleza. Típicamente, una "proteína aislada" constituye al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el

25 % o al menos aproximadamente el 50 % de una muestra determinada. ADN, ADNc, ARNm u otro ARN genómico, o de origen sintético, o cualquier combinación de estos puede codificar dicha proteína aislada. Preferentemente, la proteína aislada está sustancialmente libre de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que podrían interferir con su uso terapéutico, de diagnóstico, profiláctico, de búsqueda u otro uso.

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

Una "variante" de un polipéptido (p. ej., una proteína de unión a antígenos o un anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos en donde uno o más residuos de aminoácidos se insertan, eliminan y/o sustituyen en la secuencia de aminoácidos con relación a otra secuencia de polipéptidos. Las variantes incluyen proteínas de fusión.

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

Al calcular el porcentaje de identidad, las secuencias que se comparan se alinean típicamente de una manera que da la mayor coincidencia entre las secuencias. Un ejemplo de un programa informático que se puede utilizar para determinar el porcentaje de identidad es el paquete informático GCG, que incluye GAP (Devereux y col., 1984, *Nucl. Acid Res.* 12: 387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI). El algoritmo informático GAP se utiliza para alinear los dos polipéptidos o polinucleótidos para los que se determinará el porcentaje de identidad. Las secuencias se alinean para obtener coincidencia óptima de su aminoácido o nucleótido respectivo (el "rango de coincidencias", determinado por el algoritmo). Se utilizan una penalización por apertura de espacios (que se calcula como 3x la diagonal

promedio, en donde la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que se está utilizando; la "diagonal" es el puntaje o la cantidad asignada a cada coincidencia de aminoácidos perfecta por la matriz de comparación específica), una penalización por extensión de espacios (que es generalmente 1/10 veces la penalización por apertura de espacios) y una matriz de comparación, por ejemplo, PAM 250 o BLOSum 62 en combinación con el algoritmo. En determinadas realizaciones, el algoritmo también utiliza una matriz de comparación estándar (véase, Dayhoff y col., 1978, *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5: 345-352 para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff y col., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 89: 10915-10919 para la matriz de comparación BLOSum 62).

Los siguientes son ejemplos de los parámetros que se pueden emplear para determinar el porcentaje de identidad para las secuencias de polipéptidos o nucleótidos que utilizan el programa GAP:

- Algoritmo: Needleman y col., 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453
- Matriz de comparación: BLOSum 62 de Henikoff y col., 1992, mencionado anteriormente
- Penalización por espacios: 12 (pero sin penalización para los espacios finales)
- Penalización por longitud de espacios: 4
- Umbral de similitud: 0

Determinados esquemas de alineamiento para alinear dos secuencias de aminoácidos puede provocar coincidencia solamente de una región corta de las dos secuencias y esta región pequeña alineada puede tener identidad de secuencia muy alta aunque no haya una relación significativa entre las dos secuencias completas. Por lo tanto, el método de alineamiento seleccionado (programa GAP) se puede ajustar, si se desea, para producir un alineamiento que abarca al menos 50 u otro número de aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

Según se emplea aquí, los veinte aminoácidos convencionales (p. ej., naturales) y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology--A Synthesis* (2ª Edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), que se incorpora al presente por referencia para cualquier fin. Los estereoisómeros (p. ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, los aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α -, α -disustituidos, los aminoácidos N-alquilo, el ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fosfofoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e

iminoácidos similares (p. ej., 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptido que se utiliza aquí, la dirección hacia la izquierda es la dirección del extremo amino terminal y la dirección hacia la derecha es la dirección del extremo carboxilo terminal, de acuerdo con el uso y convención estándar.

5 De forma similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos de cadena única es el extremo 5'; la dirección hacia la izquierda de las secuencias de polinucleótidos de cadena doble se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' de transcripciones de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción; las regiones de secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia
10 que el ARN y que son de 5' al extremo 5' del ARN se denominan "secuencias cadena arriba"; las regiones de secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que la transcripción de ARN que son de 3' al extremo 3' de la transcripción de ARN se denominan "secuencias cadena abajo".

15 Las sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden abarcar residuos de aminoácidos de origen no natural, que se incorporan típicamente a través de síntesis químicas de péptidos en lugar de síntesis en sistemas biológicos. Estos comprenden peptidomiméticos y otras formas invertidas de grupos de aminoácidos.

Los residuos de origen natural se pueden dividir en clases según las propiedades comunes de la cadena lateral:

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

Por ejemplo, las sustituciones no conservadoras pueden comprender el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Dichos residuos sustituidos se pueden introducir, por ejemplo, en regiones del anticuerpo de un ser humano homólogas con anticuerpos no humanos, o en regiones no homólogas de la molécula.

30 Al realizar cambios en la proteína de unión a antígenos o la proteína PCSK9, de acuerdo con determinadas realizaciones, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le asignó un índice hidropático en función de su hidrofobicidad y características de carga. Ellos 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); triptofano (-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).

5 En la técnica, se entiende la importancia del índice hidropático de los aminoácidos para otorgarle una función biológica interactiva a una proteína. Kyte y col., J. Mol. Biol., 157: 105-131 (1982). Se sabe que determinados aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos con un puntaje o índice hidropático similar y aún así mantendrán una actividad biológica similar. Al realizar cambios en función del índice hidropático, en determinadas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos se encuentran dentro de ± 2 . En 10 determinadas realizaciones, se incluyen las que se encuentran dentro de ± 1 y en determinadas realizaciones, se incluyen las que se encuentran dentro de ± 0.5 .

En la técnica, también se entiende que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar de manera eficaz en función de la hidrofiliidad, específicamente cuando el péptido o la proteína funcional desde el punto de vista biológico así creados se pretenden 15 utilizar en realizaciones inmunológicas, como en el presente caso. En determinadas realizaciones, la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, regida por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a estos residuos de 20 aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 $\pm$ 1); glutamato (+3,0 $\pm$ 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 $\pm$ 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 triptofano (-3,4). Al realizar cambios en función de valores de hidrofiliidad similares, en determinadas realizaciones, se incluye la sustitución de 25 aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad se encuentran dentro de ± 2 , en determinadas realizaciones, se incluyen las que se encuentran dentro de ± 1 y en determinadas realizaciones, se incluyen las que se encuentran dentro de ± 0.5 . También se pueden identificar epítomos de secuencias de aminoácidos primarias en función de la hidrofiliidad. Estas regiones también se denominan "regiones nucleares epitópicas".

30 En la tabla 1 se presentan sustituciones de aminoácidos ejemplares.

TABLA 1
Sustituciones de aminoácidos

Residuos originales	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ácido diaminobutírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

El término "derivado" se refiere a una molécula que incluye una modificación química diferente a la inserción, eliminación o sustitución de aminoácidos (o ácidos nucleicos). En determinadas realizaciones, los derivados comprenden modificaciones covalentes, incluso, entre otros, unión química con polímeros, lípidos u otras fracciones orgánicas o inorgánicas. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígenos modificada químicamente puede tener una mayor vida media en circulación que una proteína de unión a antígenos que no está modificada químicamente. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígenos modificada químicamente puede tener mejor capacidad de focalización para células, tejidos y/u órganos deseados. En algunas realizaciones, una proteína de unión a antígenos derivada se modifica por enlace covalente para incluir una o más uniones a polímero soluble en agua, incluso, entre otros, polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol. Véase, p. ej., las patentes estadounidenses N.º: 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 y 4.179.337. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígenos derivada comprende uno o más polímeros, incluso, entre otros, monometoxi-polietilenglicol, dextrano,

celulosa u otros polímeros basados en carbohidratos, poli(N-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilado (p. ej., glicerol) y polivinilalcohol, así como mezclas de dichos polímeros.

En determinadas realizaciones, un derivado se modifica por enlace covalente con subunidades de polietilenglicol (PEG). En determinadas realizaciones, uno o más polímeros solubles en agua se enlazan a una o más posiciones específicas, por ejemplo en el extremo amino terminal, de un derivado. En determinadas realizaciones, uno o más polímeros solubles en agua se unen aleatoriamente a una o más cadenas laterales de un derivado. En determinadas realizaciones, se utiliza PEG para mejorar la capacidad terapéutica de una proteína de unión a antígenos. En determinadas realizaciones, se utiliza PEG para mejorar la capacidad terapéutica de un anticuerpo humanizado. Algunos de dichos métodos se plantean, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 6.133.426, que se incorpora al presente por referencia para cualquier fin.

En la industria farmacéutica comúnmente se utilizan análogos de péptidos como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15: 29 (1986); Veber & Freidinger, TINS, p.392 (1985); y Evans y col., J. Med. Chem., 30: 1229 (1987), que se incorporan al presente por referencia para cualquier fin. Dichos compuestos suelen desarrollarse con la ayuda del modelado molecular computarizado. Se pueden utilizar miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a los péptidos útiles terapéuticamente para producir un efecto terapéutico o profiláctico similar. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), por ejemplo anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos uniones opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado de: $--CH_2 NH--$, $--CH_2 S--$, $--CH_2 -CH_2 --$, $--CH=CH-$ (cis y trans), $--COCH_2 --$, $--CH(OH)CH_2 --$ y $--CH_2 SO--$, a través de métodos conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones, se puede utilizar una sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (p. ej., D-lisina en lugar de L-lisina) para generar péptidos más estables. Además, se pueden generar péptidos restringidos que comprenden una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica a través de métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch, Ann. Rev. Biochem., 61: 387 (1992), incorporados en el presente por referencia para cualquier fin); por ejemplo, mediante la adición de residuos de cisteína internos que pueden formar puentes disulfuro intramoleculares que cicla el péptido.

El término "de origen natural", según se emplea aquí, a lo largo de la memoria descriptiva con relación a los materiales biológicos tales como polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped y similares, se refiere a materiales que se encuentran en la naturaleza o una forma de los materiales que se encuentran en la naturaleza.

- 5 Una "proteína de unión a antígenos" ("ABP"), según se emplea aquí, significa cualquier proteína que se une a un antígeno diana especificado. En la presente solicitud, el antígeno diana especificado es la proteína PCSK9 o fragmento de esta. "Proteína de unión a antígenos" incluye, entre otros, anticuerpos y partes de unión de estos, por ejemplo fragmentos inmunológicamente funcionales. Los cuerpos peptídicos son otro ejemplo de proteínas de unión
- 10 a antígenos. El término "fragmento inmunológicamente funcional" (o simplemente "fragmento") de una proteína de unión a antígenos de un anticuerpo o de una cadena de inmunoglobulina (cadena pesada o ligera), según se emplea aquí, es una especie de proteína de unión a antígenos que comprende una porción (independientemente de cómo se obtiene o sintetiza esa porción) de un anticuerpo que carece de al menos algunos de los aminoácidos presentes en
- 15 una cadena completa pero que todavía puede unirse específicamente a un antígeno. Dichos fragmentos son biológicamente activos porque se unen al antígeno diana y pueden competir con otras proteínas de unión a antígenos, incluso anticuerpos intactos, para unirse a un determinado epítipo. En algunas realizaciones, los fragmentos son fragmentos neutralizantes. En algunas realizaciones, los fragmentos pueden bloquear o reducir la posibilidad de interacción
- 20 entre LDLR y PCSK9. En un aspecto, este fragmento retendrá al menos una CDR presente en la cadena ligera o pesada completa y en algunas realizaciones comprenderá una única cadena pesada y/o cadena ligera o parte de esta. Estos fragmentos biológicamente activos se pueden producir a través de técnicas de ADN recombinante o se pueden producir por escisión enzimática o química de proteínas de unión a antígenos, incluso anticuerpos intactos. Los
- 25 fragmentos de inmunoglobulina inmunológicamente funcionales incluyen, entre otros, Fab, un diacuerpo (dominio variable de cadena pesada en el mismo polipéptido que un dominio variable de cadena ligera, conectado mediante un ligador peptídico corto que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena), Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos del dominio y anticuerpos de cadena única y se pueden derivar de cualquier fuente de mamíferos,
- 30 incluso, entre otros, ser humano, ratón, rata, camélido o conejo. Además, se contempla que una parte funcional de las proteínas de unión a antígenos divulgadas en el presente, por ejemplo, una o más CDR, puede estar unida por enlace covalente a una segunda proteína o a una molécula pequeña para crear un agente terapéutico dirigido a una diana particular en el cuerpo, poseer propiedades terapéuticas bifuncionales o tener una vida media en suero prolongada.

Como apreciarán los entendidos en la técnica, una proteína de unión a antígenos puede incluir componentes no proteicos. En algunas secciones de la presente divulgación, se describen ejemplos de ABP en términos de "número/letra/número" (p. ej., 25A7). En estos casos, el nombre exacto denota un anticuerpo específico. Es decir, una ABP denominada 25A7 no es necesariamente la misma que un anticuerpo denominado 25A7.1, (a menos que se describan explícitamente como lo mismo en la especificación, p. ej., 25A7 y 25A7.3). Como apreciará el entendido en la técnica, en algunas realizaciones el LDLR no es una proteína de unión a antígenos. En algunas realizaciones, las subsecciones de unión de LDLR no son proteínas de unión a antígenos, p. ej., EGFA. En algunas realizaciones, otras moléculas a través de las cuales PCSK9 señala *in vivo* no son proteínas de unión a antígenos. Dichas realizaciones se identificarán explícitamente como tales.

Determinadas proteínas de unión a antígenos descritas aquí son anticuerpos o derivan de anticuerpos. En determinadas realizaciones, la estructura de polipéptidos de las proteínas de unión a antígenos se basa en anticuerpos, incluso, entre otros, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos del dominio, anticuerpos sintéticos (a veces denominados aquí "anticuerpos miméticos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, fusiones de anticuerpos (a veces denominados aquí "conjugados de anticuerpos") y fragmentos de estos, respectivamente. En algunas realizaciones, la ABP comprende o consiste en "avimers" (péptido de unión fuerte). Estas diversas proteínas de unión a antígenos se describen adicionalmente en el presente.

Una región "Fc" comprende dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios C_{H1} y C_{H2} de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen unidos por dos o más enlaces disulfuro y por interacciones hidrofóbicas de los dominios C_{H3} .

Un "fragmento Fab" comprende una cadena ligera y el C_{H1} y regiones variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

Un "fragmento Fab'" comprende una cadena ligera y una porción de una cadena pasada que contiene el dominio VH y el dominio C_{H1} y también la región entre los dominios C_{H1} y C_{H2} , de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercadena entre las dos cadenas pesadas de los dos fragmentos Fab' para formar una molécula $F(ab')_2$.

Un "fragmento $F(ab')_2$ " contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios C_{H1} y C_{H2} , de modo que se forma un enlace disulfuro intercadena entre las dos cadenas pesadas. Por lo tanto, un fragmento $F(ab')_2$ se compone por dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos por un enlace

disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

La "región Fv" comprende las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, pero carece de regiones constantes.

5 Los "anticuerpos de cadena única" son moléculas Fv en las cuales se han conectado las regiones variables de cadena pesada y ligera mediante un ligador flexible para formar una única cadena polipeptídica, que forma una región de unión a antígenos. Los anticuerpos de cadena única se plantean detalladamente en la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 88/01649 y las patentes estadounidenses N.º 4.946.778 y N.º 5.260.203, cuyas divulgaciones se incorporan por referencia.

10 Un "anticuerpo de dominio" es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene solamente la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunas instancias, dos o más regiones V_H se unen por enlace covalente con un ligador peptídico para crear un anticuerpo de dominio bivalente. Las dos regiones V_H de un anticuerpo de dominio bivalente se pueden dirigir a los mismos antígenos o a
15 antígenos diferentes.

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

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

Una proteína de unión a antígenos o anticuerpo "biespecífica", "de doble especificidad" o "bifuncional" es una proteína de unión a antígenos o anticuerpo híbrido, respectivamente, que
25 tiene dos sitios de unión a antígenos diferentes. Las proteínas de unión a antígenos y anticuerpos biespecíficos son una especie de anticuerpo de proteína de unión a antígenos multiespecífica y se pueden producir a través de diversos métodos que incluyen, entre otros, fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, p. ej., Songsivilai y Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321; Kostelny y col., 1992, *J. Immunol.* 148: 1547-1553. Los dos
30 sitios de unión de una proteína de unión a antígenos o anticuerpo biespecífico se unirán a dos epítopos diferentes, que pueden estar en las mismas dianas de proteínas o en diferentes dianas de proteínas.

Se dice que una proteína de unión a antígenos "se une específicamente" a su antígeno

diana cuando la constante de disociación (K_d) es $\leq 10^{-7}$ M. La ABP se une específicamente al antígeno con “afinidad alta” cuando la K_d es $\leq 5 \times 10^{-9}$ M y con “afinidad muy alta” cuando la K_d es $\leq 5 \times 10^{-10}$ M. En una realización, la ABP tiene una K_d de $\leq 10^{-9}$ M. En una realización, la constante de disociación es $< 1 \times 10^{-5}$. En otras realizaciones, las ABP se unirán a la PCSK9 humana con una K_d de entre aproximadamente 10^{-9} M y 10^{-13} M y, en otra realización, las ABP se unirán con una $K_d \leq 5 \times 10^{-10}$. Como apreciará el entendido en la técnica, en algunas realizaciones, cualquiera o todos los fragmentos de unión a antígenos se pueden unir específicamente a PCSK9.

Una proteína de unión a antígenos es “selectiva” cuando se une a una diana con más firmeza que con la que se une a una segunda diana.

“Región de unión a antígenos” significa una proteína, o una porción de una proteína, que se une específicamente a un antígeno especificado (p. ej., un paratopo). Por ejemplo, la porción de una proteína de unión a antígenos que contiene los residuos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y que otorgan a la proteína de unión a antígenos su especificidad y afinidad por el antígeno se denomina “región de unión a antígenos”. Una región de unión a antígenos típicamente incluye una o más “regiones de unión complementarias” (“CDR”). Determinadas regiones de unión a antígenos también incluyen una o más regiones “marco”. Una “CDR” es una secuencia de aminoácidos que contribuye a la afinidad y especificidad de unión del antígeno. Las regiones “marco” pueden ayudar en el mantenimiento de la conformación adecuada de las CDR para promover la unión entre la región de unión a antígenos y un antígeno. Estructuralmente, las regiones marco pueden estar ubicadas en los anticuerpos entre las CDR. En las figuras 2A-3D, 3CCC-3JJJ se muestran ejemplos de regiones marco y CDR. En algunas realizaciones, las secuencias para las CDR para la cadena ligera del anticuerpo 3B6 son del siguiente modo: CDR1 TLSSGYSSYEVD (SEC. ID. N.º: 279); CDR2 VDTGGIVGSKGE (SEC. ID. N.º: 280); CDR3 GADHGSGTNFVVV (SEC. ID. N.º: 281) y las FR son del siguiente modo: FR1 QPVLTQPLFASASLGASVTLTC (SEC. ID. N.º: 282); FR2 WYQQRPGKGPRFVMR (SEC. ID. N.º: 283); FR3 GIPDRFSVLGSGLNRYLTIKNIQEEDESDYHC (SEC. ID. N.º: 284); y FR4 FGGGTKLTVL (SEC. ID. N.º: 285).

En determinados aspectos, se determinan proteínas de unión a antígenos recombinantes que se unen a PCSK9, por ejemplo PCSK9 humana. En este contexto, una “proteína de unión a antígenos recombinante” es una proteína hecha utilizando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se describe aquí. En la técnica se conocen métodos y técnicas para la producción de proteínas

recombinantes.

El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta de cualquier isotipo, o un fragmento de esta que pueden competir con el anticuerpo intacto para la unión específica al antígeno diana e incluye, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, completamente humanos y biespecíficos. Un "anticuerpo" es una especie de una proteína de unión a antígenos. Un anticuerpo intacto generalmente comprenderá al menos dos cadenas pesadas completas y dos cadenas ligeras completas, pero en algunos casos puede incluir menos cadenas tal como los anticuerpos de origen natural en camélidos que pueden comprender solamente cadenas pesadas. Los anticuerpos pueden derivar únicamente de una sola fuente, o pueden ser "quiméricos", es decir, porciones diferentes del anticuerpo pueden derivar de dos diferentes anticuerpos como se describe adicionalmente a continuación. Las proteínas de unión a antígenos, los anticuerpos o los fragmentos de unión se pueden producir en hibridomas, a través de técnicas de ADN recombinantes, o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. A menos que se indique lo contrario, el término "anticuerpo" incluye, además de anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas completas y dos cadenas ligeras completas, derivados, variantes, fragmentes y muteínas de este, ejemplos de los cuales se describen a continuación. Además, menos que se excluya expresamente, los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos del dominio, anticuerpos sintéticos (a veces denominados aquí "anticuerpos miméticos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, fusiones de anticuerpos (a veces denominados aquí "conjugados de anticuerpos") y fragmentos de estos, respectivamente. En algunas realizaciones, el término solamente comprende cuerpos peptídicos.

Las unidades estructurales de anticuerpos de origen natural típicamente comprenden un tetrámero. Cada uno de los tetrámeros típicamente se compone por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" completa (en determinadas realizaciones, aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" completa (en determinadas realizaciones, aproximadamente 50-70 kDa). La porción del extremo amino terminal de cada cadena típicamente incluye una región variable de entre aproximadamente 100 y 110 o más aminoácidos que típicamente es responsable del reconocimiento de antígenos. La porción del extremo carboxilo terminal de cada cadena típicamente define una región constante que puede ser responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican típicamente como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas típicamente se clasifican como mu, delta, gamma, alfa, o epsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e

IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, incluso, entre otros, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene subclases que incluyen, entre otros, IgM1 e IgM2. IgA se subdivide de manera similar en subclases que incluyen, entre otros, IgA1 e IgA2. Dentro de las cadenas ligera y pesada completas, típicamente, las regiones variable y constante se unen mediante una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos y la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. Véase, p. ej., *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2º ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (incorporado por referencia en su totalidad a todos los efectos). Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada típicamente forman los sitios de unión a antígenos.

10 Las regiones variables típicamente presentan la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas mediante tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de dos cadenas de cada par típicamente se alinean mediante las regiones marco, que pueden permitir la unión a un epítipo específico. Desde el terminal N hasta el terminal C, las regiones variables

15 de cadena ligera y pesada típicamente comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos para cada dominio se realiza típicamente de acuerdo con las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)) o Chothia & Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987); Chothia y col., Nature, 342: 878-883 (1989).

20 En determinadas realizaciones, una cadena pesada de anticuerpo se une a un antígeno en ausencia de una cadena ligera de anticuerpo. En determinadas realizaciones, una cadena ligera de anticuerpo se une a un antígeno en ausencia de una cadena pesada de anticuerpo. En determinadas realizaciones, una región de unión de anticuerpo se une a un antígeno en ausencia de una cadena ligera de anticuerpo. En determinadas realizaciones, una

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

30 En determinadas realizaciones, la delineación definitiva de una CDR y la identificación de residuos que comprenden el sitio de unión de un anticuerpo se logra mediante la resolución de la estructura del anticuerpo y/o la resolución de la estructura el complejo anticuerpo-ligando. En determinadas realizaciones, esto se puede lograr a través de cualquiera de diversas técnicas conocidas para los entendidos en la técnica, por ejemplo cristalografía de rayos X. En determinadas realizaciones, se pueden emplear diversos métodos de análisis para identificar o aproximar las regiones CDR. Ejemplos de dichos métodos incluyen, entre otros, la definición de

Kabat, la definición de Chothia, la definición de AbM y la definición de contacto.

La definición de Kabat es un estándar para enumerar los residuos en un anticuerpo y se utiliza típicamente para identificar regiones CDR. Véase, p. ej., Johnson & Wu, *Nucleic Acids Res.*, 28: 214-8 (2000). La definición de Chothia es similar a la definición de Kabat, pero la definición de Chothia considera las posiciones de determinadas regiones bucle estructurales. Véase, p. ej., Chothia y col., *J. Mol. Biol.*, 196: 901-17 (1986); Chothia y col., *Nature*, 342: 877-83 (1989). La definición de AbM utiliza un conjunto integrado de programas informáticos producidos por Oxford Molecular Group que modelan la estructura del anticuerpo. Véase, p. ej., Martin y col., *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 86: 9268-9272 (1989); "AbM™, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies," Oxford, RU; Oxford Molecular, Ltd. La definición de AbM modela la estructura terciaria de un anticuerpo a partir de la secuencia primaria utilizando una combinación de bases de datos de conocimiento y métodos *ab initio*, por ejemplo los descritos por Samudrala y col., "Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach," en *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3: 194-198 (1999). La definición de contacto se base en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Véase, p. ej., MacCallum y col., *J. Mol. Biol.*, 5: 732-45 (1996).

Por convención, las regiones CDR en la cadena pesada típicamente se denominan H1, H2 y H3 y se numeradas secuencialmente en la dirección desde el extremo amino terminal hacia el extremo carboxilo terminal. Las regiones CDR en la cadena ligera típicamente se denominan L1, L2 y L3 y se numeran secuencialmente en la dirección desde el extremo amino terminal hacia el extremo carboxilo terminal.

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

El término "cadena pesada" incluye una cadena pesada completa y fragmentos de esta que tienen suficiente secuencia de región variable para conferir especificidad de unión. Una cadena pesada completa incluye un dominio de región variable, V_H y tres dominios de región constante, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . El dominio V_H se encuentra en el extremo amino terminal del polipéptido y los dominios C_H se encuentran en el extremo carboxilo terminal, con el C_{H3} cerca del extremo carboxilo terminal del polipéptido. Las cadenas pesadas pueden ser de cualquier isotipo, incluso IgG (incluso los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (incluso los subtipos IgA1 e IgA2), IgM e IgE.

Un anticuerpo biespecífico o bifuncional típicamente es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir a través de diversos métodos que incluyen, entre otros, fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, p. ej., Songsivilai y col., Clin. Exp. Immunol., 79: 315-321 (1990); Kostelny y col., J. Immunol., 148: 1547-1553 (1992).

Algunas especies de mamíferos también producen anticuerpos que tienen solamente una única cadena pesada.

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

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere a una porción de las cadenas ligera y/o pesada de un anticuerpo, que típicamente incluye aproximadamente los aminoácidos del 120 al 130 del extremo amino terminal en la cadena pesada y entre aproximadamente 100 y 110 aminoácidos del extremo amino terminal en la cadena ligera. En determinadas realizaciones, las regiones variables de diferentes anticuerpos difieren ampliamente en la secuencia de aminoácidos incluso entre anticuerpos de la misma especie. La región variable de un anticuerpo típicamente determina la especificidad de un anticuerpo particular para su diana.

El término "proteína de unión a antígenos neutralizante" o "anticuerpo neutralizante" se refiere a una proteína de unión a antígenos o anticuerpo, respectivamente, que se une a un ligando y evita o reduce el efecto biológico de ese ligando. Esto se puede realizar, por ejemplo, bloqueando directamente un sitio de unión en el ligando o uniéndose al ligando y alterando la capacidad del ligando de unirse a través de medios indirectos (por ejemplo alteraciones estructurales o energéticas en el ligando). En algunas realizaciones, el término también denota una proteína de unión a antígenos que evita que la proteína a la que está unida realice una función biológica. Al evaluar la unión y/o especificidad de una proteína de unión a antígenos, p.

ej., un anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional de este, un anticuerpo o fragmento puede inhibir sustancialmente la unión de un ligando a su compañero de unión cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de compañero de unión unida al ligando en al menos aproximadamente el 1-20 %, el 20-30 %, el 30-40 %, el 40-50 %, el 50-60 %, el 60-70 %, el 70-80 %, el 80-85 %, el 85-90 %, el 90-95 %, el 95-97 %, el 97-98 %, el 98-99 % o más (según lo medido en un ensayo de unión competitiva *in vitro*). En algunas realizaciones, en el caso de las proteínas de unión a antígenos PCSK9, esa molécula neutralizante puede disminuir la capacidad de PCSK9 de unirse a LDLR. En algunas realizaciones, la capacidad neutralizante se caracteriza y/o describe mediante un ensayo de competición. En algunas realizaciones, la capacidad neutralizante se describe en términos de un valor de IC₅₀ o EC₅₀. En algunas realizaciones, ABP 27B2, 13H1, 13B5 y 3C4 no son neutralizantes, ABP, 3B6, 9C9 y 31A4 son neutralizadores débiles y las ABP restantes en la tabla 2 son neutralizadores fuertes. En algunas realizaciones, los anticuerpos o proteínas de unión a antígenos neutralizan al unirse a PCSK9 y evitan que PCSK9 se una a LDLR (o reducen la capacidad de PCSK9 de unirse a LDLR). En algunas realizaciones, los anticuerpos o ABP neutralizan al unirse a PCSK9 y mientras continúan permitiendo PCSK9 se una a LDLR, evitan o reducen la degradación mediada por PCSK9 de LDLR. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una ABP o anticuerpo neutralizante aún puede permitir la unión PCSK9/LDLR, pero evitará (o reducirá) la posterior degradación que implica PCSK9 de LDLR.

El término “diana” se refiere a una molécula o una porción de una molécula que se puede unir mediante una proteína de unión a antígenos. En determinadas realizaciones, una diana puede tener uno o más epítopos. En determinadas realizaciones, una diana es un antígeno. El uso de “antígeno” en la frase “proteína de unión a antígenos” denota simplemente que la secuencia de la proteína que comprende el antígeno se puede unir mediante un anticuerpo. En este contexto, no se necesita que la proteína sea extraña o que pueda inducir una respuesta inmune.

El término “competir” cuando se utiliza en el contexto de proteínas de unión a antígenos (p. ej., proteínas de unión a antígenos neutralizantes o anticuerpo neutralizantes) que compiten por el mismo epítipo significa competición entre proteínas de unión a antígenos según lo determinado por un ensayo en el cual la proteína de unión a antígenos (p. ej., anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional de este) que se evalúa evita o inhibe (p. ej., reduce) la unión específica de una proteína de unión a antígenos de referencia (p. ej., un ligando o un anticuerpo de referencia) con un antígeno común (p. ej., PCSK9 o un fragmento de esta). Se pueden utilizar numerosos tipos de ensayos de unión competitiva para determinar si

una proteína de unión a antígenos compite con otra, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto de fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA) directo o indirecto de fase sólida, ensayo de competición "sándwich" (véase, p. ej., Stahli y col., 1983, *Methods in Enzymology* **9**: 242-253); EIA con biotina/avidina directo de fase sólida (véase, p. ej., Kirkland y col., 1986, *J. Immunol.* **137**: 3614-3619) ensayo de marcado directo de fase sólida, ensayo "sándwich" de marcado directo de fase sólida (véase, p. ej., Harlow y Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA de marcador directo de fase sólida que utiliza marcador I-125 (véase, p. ej., Morel y col., 1988, *Molec. Immunol.* **25**: 7-15); EIA con biotina/avidina directo de fase sólida (véase, p. ej., Cheung y col., 1990, *Virology* **176**: 546-552); y RIA de marcado directo (Moldenhauer y col., 1990, *Scand. J. Immunol.* **32**: 77-82). Típicamente, este ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que contienen cualquiera de estos, una proteína de unión a antígenos de la prueba no marcada y una proteína de unión a antígenos de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de etiqueta unido a la superficie sólida o células en presencia de la proteína de unión a antígenos de la prueba. Usualmente la proteína de unión a antígenos de la prueba está presente en exceso. Las proteínas de unión a antígenos identificadas mediante ensayo de competición (proteínas de unión a antígenos de competencia) incluyen proteínas de unión a antígenos que se unen al mismo epítipo que las proteínas de unión a antígenos de referencia y las proteínas de unión a antígenos que se unen a un epítipo adyacente lo suficientemente próximo al epítipo unido mediante la proteína de unión a antígenos de referencia para que se produzca el impedimento estérico. En los ejemplos del presente se proporcionan detalles adicionales con respecto a los métodos para determinar unión competitiva. Usualmente, cuando una proteína de unión a antígenos de competencia está presente en exceso, inhibirá (p. ej., reducirá) la unión específica de una proteína de unión a antígenos de referencia con un antígeno común en al menos el 40-45 %, el 45-50 %, el 50-55 %, el 55-60 %, el 60-65 %, el 65-70 %, el 70-75 % o el 75 % o más. En algunos casos, la unión se inhibe en al menos el 80-85 %, el 85-90 %, el 90-95 %, el 95-97 % o el 97 % o más.

El término "antígeno" se refiere a una molécula o una porción de una molécula que se puede unir mediante un agente de unión selectivo, por ejemplo una proteína de unión a antígenos (incluso, p. ej., un anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional de este). En algunas realizaciones, el antígeno se puede utilizar en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a ese antígeno. Un antígeno puede poseer uno o más epítopos que son capaces de interactuar con diferentes proteínas de unión a antígenos, p. ej., anticuerpos.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante que se pueda unir mediante una

proteína de unión a antígenos, por ejemplo un anticuerpo o a un receptor de células T. Un epítipo es una región de un antígeno que está unida mediante una proteína de unión a antígenos que se dirige hacia ese antígeno y, cuando el antígeno es una proteína, incluye aminoácidos específicos que se ponen en contacto directamente con la proteína de unión a antígenos. Por lo general, los epítipos residen en proteínas, pero en algunos casos pueden residir en otros tipos de moléculas, por ejemplo ácidos nucleicos. Los determinantes de epítipos pueden incluir grupos de moléculas con superficie químicamente activa, por ejemplo aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, grupos fosforilo o sulfonilo y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Generalmente, los anticuerpos específicos para un antígeno diana particular preferentemente reconocerán un epítipo en el antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

Según se emplea aquí, "sustancialmente puro" significa que la especie de molécula descrita es la especie predominante presente, es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la misma mezcla. En determinadas realizaciones, una molécula sustancialmente pura es una composición en donde la especie objeto comprende al menos el 50 % (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En otras realizaciones, una composición sustancialmente pura comprenderá al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En otras realizaciones, la especie objeto se purifica hasta la homogeneidad esencial en donde las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición a través de métodos de detección convencionales y, por lo tanto, la composición consiste en una sola especie macromolecular detectable.

El término "agente" se utiliza en la presente para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos.

Según se emplean aquí, los términos "etiqueta" o "marcado" se utilizan para hacer referencia a la incorporación de un marcador detectable, p. ej., mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de fracciones de biotina que se pueden detectar mediante una avidina marcada (p. ej., estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar a través de métodos ópticos o calorimétricos). En determinadas realizaciones, la etiqueta o marcador también puede ser terapéutico. En la técnica se conocen y se pueden utilizar varios métodos de marcado de polipéptidos y de glicoproteínas. Los siguientes son algunos ejemplos de etiquetas para los

polipéptidos: radioisótopos o radionucleidos (p. ej., ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), etiquetas fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, fósforos a base de lantánidos), etiquetas enzimáticas (p. ej., peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscente, grupos biotinil, epítomos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (p. ej., secuencias pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítomos). En determinadas realizaciones, las etiquetas están unidas por un brazo espaciador de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

El término “muestra biológica”, según se emplea aquí, incluye, entre otros, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o ser vivo anterior. Dichos seres vivos incluyen, entre otros, seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos y otros animales. Dichas sustancias incluyen, entre otros, sangre, suero, orina, células, órganos, tejidos, hueso, médula ósea, ganglios linfáticos y piel.

El término “composición de agente farmacéutico” (o agente o fármaco), según se emplea aquí, se refiere a un compuesto químico, composición, agente o fármaco que puede inducir un efecto terapéutico deseado cuando se le administra debidamente a un paciente. No requiere necesariamente más de un tipo de ingrediente.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de una proteína de unión a antígenos PCSK9 determinada para producir una respuesta terapéutica en un mamífero. Los entendidos en la técnica determinan fácilmente dichas cantidades terapéuticamente eficaces.

El término “modulador”, según se emplea aquí, es un compuesto que cambia o altera la actividad o función de una molécula. Por ejemplo, un modulador puede provocar un aumento o disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de una molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del modulador. En determinadas realizaciones, un modulador es un inhibidor, que disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. Determinadas actividades y funciones de una moléculas ejemplares incluyen, entre otros, afinidad de unión, actividad enzimática y transducción de señales. Determinados inhibidores ejemplares incluyen, entre otros, proteínas, péptidos, anticuerpos, cuerpos peptídicos, carbohidratos o moléculas orgánicas pequeñas. Los cuerpos peptídicos se describen en, p. ej., la patente estadounidense N.º 6.660.843 (correspondiente a la solicitud de PCT N.º WO 01/83525).

Los términos “paciente” y “sujeto” se utilizan de forma alternativa e incluyen sujetos animales humanos y no humanos así como los que tiene trastornos diagnosticados

formalmente, los que no tienen trastornos reconocidos formalmente, los que reciben atención médica, los que están en riesgo de desarrollar los trastornos, etc.

El término “tratar” y “tratamiento” incluyen tratamientos terapéuticos, tratamientos profilácticos y aplicaciones en las cuales se reduce el riesgo de que un sujeto desarrolle un trastorno u otros factor de riesgo. El tratamiento no requiere la cura completa de un trastorno y comprende realizaciones en las cuales se reduce los síntomas o los factores de riesgo subyacentes.

El término “prevenir” no requiere el 100 % de eliminación de la posibilidad de un evento. En lugar de eso, denota que la probabilidad de aparición del evento se ha reducido en presencia del compuesto o método.

Se pueden utilizar técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y transformación y cultivo de tejidos (p. ej., electroporación, lipofección). Se pueden realizar reacciones enzimática y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en el presente. Las técnicas y procedimientos anteriores generalmente se pueden realizar de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica y según se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y plantean a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, p. ej., Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^o ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que se incorpora en el presente por referencia para cualquier fin. A menos que se proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas utilizadas y las técnicas y procedimientos de laboratorio, con relación a la química analítica, la química orgánica sintética y la química médica y farmacéutica descritas en el presente, son las conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se pueden utilizar técnicas estándar para las síntesis químicas, los análisis químicos, la formulación, la administración y la preparación farmacéutica y el tratamiento de pacientes.

Proteínas de unión a antígenos para PCSK9

La proproteína convertasa subtilisina kexina tipo 9 (PCSK9) es una serina proteasa implicada en la regulación de los niveles de proteína del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (Horton y col., 2007; Seidah y Prat, 2007). PCSK9 es una prohormona-proproteína convertasa en la familia subtilisina (S8) de serina proteasas (Seidah y col., 2003). Una secuencias de aminoácidos de PCSK9 humana ejemplar se presenta como SEC. ID. N.º: 1 y 3 en la figura 1A (que presenta el “pro” dominio de la proteína subrayado) y en la figura 1B (que presenta la secuencia señal en negrita y el prodominio subrayado). Una secuencia

codificante de PCSK9 humana se presenta como SEC. ID. N.º: 2 (figura 1B). Según se describe aquí, las proteínas PCSK9 también pueden incluir fragmentos de la proteína PCSK9 completa. Se resolvió la estructura de la proteína PCSK9 por dos grupos (Cunningham y col., Nature Structural & Molecular Biology, 2007 y Piper y col., Structure, 15: 1-8, 2007), la totalidad de los
5 cuales se incorporan aquí por referencia. PCSK9 incluye una secuencia señal, un prodominio del terminal N, un dominio catalítico parecido a subtilisina y un dominio del terminal C.

En el presente se proporcionan proteínas de unión a antígenos (ABP) que se unen a PCSK9, incluso PCSK9 humana. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos proporcionadas son polipéptidos que comprenden una o más regiones determinantes
10 complementarias (CDR), como se describe aquí. En algunas proteínas de unión a antígenos, las CDR están incorporadas en una región "marco", que orienta las CDR de modo que se logran las propiedades de unión a antígenos adecuadas de las CDR. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos proporcionadas en el presente pueden interferir, bloquear, reducir o modular la interacción entre PCSK9 y LDLR. Dichas proteínas de unión a antígenos se
15 indican como "neutralizantes". En algunas realizaciones, la unión entre PCSK9 y LDLR aún puede suceder, aunque la proteína de unión a antígenos sea neutralizante y se una a PCSK9. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la ABP evita o reduce la influencia negativa de PCSK9 en LDLR sin bloquear el sitio de unión de LDLR en PCSK9. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la ABP modula o altera la capacidad de PCSK9 de provocar la degradación de
20 LDLR, son tener que evitar la interacción de unión entre PCSK9 y LDLR. Dichas ABP se pueden describir específicamente como ABP "neutralizantes de forma no competitiva". En algunas realizaciones, la ABP neutralizante se une a PCSK9 en una ubicación y/o de una manera que evita que PCSK9 se una a LDLR. Dichas ABP se pueden describir específicamente como ABP "neutralizantes de forma competitiva". Ambos neutralizadores anteriores pueden dar
25 lugar a una mayor cantidad de LDLR libre presente en un sujeto, lo que provoca que se una más LDLR a LDL (reduciendo así la cantidad de LDL en el sujeto). A su vez, esto provoca una reducción en la cantidad de colesterol en suero presente en un sujeto.

En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos proporcionadas en el presente pueden inhibir la actividad mediada por PCSK9 (incluso la unión). En algunas
30 realizaciones, las proteínas de unión a antígenos que se unen a estos epítomos inhiben, entre otras cosas, las interacciones entre PCSK9 y LDLR y otros efectos fisiológicos mediados por PCSK9. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos son humanas, por ejemplo anticuerpos completamente humanos para PCSK9.

En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico de PCSK9. En algunas

realizaciones, la ABP se une a la forma madura de PCSK9. En algunas realizaciones, la ABP se une en el prodominio de PCSK9. En algunas realizaciones, la ABP se une selectivamente a la forma madura de PCSK9. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico de una forma en que PCSK9 no se puede unir o se une de manera más eficiente a LDLR. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos no se une al extremo carboxilo terminal del dominio catalítico. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos no se une al extremo amino terminal del dominio catalítico. En algunas realizaciones, la ABP no se une a los extremos amino o carboxilo terminal de la proteína PCSK9. En algunas realizaciones, la ABP se une a cualquiera de los epítomos unidos mediante los anticuerpos planteados aquí. En algunas realizaciones, esto se puede determinar por ensayos de competición entre los anticuerpos divulgados en el presente y otros anticuerpos. En algunas realizaciones, la ABP se une a un epítomo unido mediante uno de los anticuerpos descritos en la tabla 2. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos se unen a un estado conformacional específico de PCSK9 para evitar que PCSK9 interactúe con LDLR. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio V de PCSK9. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio V de PCSK9 y evita (o reduce) que PCSK9 se una a LDLR. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio V de PCSK9 y, aunque no evita (o reduce) la unión de PCSK9 con LDLR, la ABP evita o reduce las actividades adversas mediadas a través de PCSK9 en LDLR.

Las proteínas de unión a antígenos que se divulgan en el presente tienen diversas funciones. Algunas de las proteínas de unión a antígenos, por ejemplo, son útiles en ensayos de unión específicos, purificación de afinidad de PCSK9, en una PCSK9 humana particular o sus ligandos y en ensayos de clasificación para identificar otros antagonistas de la actividad de PCSK9. Algunas de las proteínas de unión a antígenos son útiles para inhibir la unión de PCSK9 con LDLR o para inhibir las actividades mediadas por PCSK9.

Las proteínas de unión a antígenos se pueden utilizar en diversas aplicaciones terapéuticas, como se explica aquí. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos PCSK9 son útiles para tratar afecciones asociadas a PCSK9, por ejemplo trastornos relacionados con el colesterol (o "trastornos relacionados con el colesterol en suero") tales como hipercolesterolemia, como se describe adicionalmente en el presente. Otros usos de las proteínas de unión a antígenos incluyen, por ejemplo, el diagnóstico de afecciones o enfermedades asociadas a PCSK9 y en ensayos de clasificación para determinar la presencia o ausencia de PCSK9. Algunas de las proteínas de unión a antígenos descritas aquí son útiles en el tratamiento de las consecuencias, los síntomas y/o la patología asociada a la actividad de PCSK9.

En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos que se proporcionan comprenden una o más CDR (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR). En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos comprende (a) una estructura de polipéptidos y (b) una o más CDR que se insertan y/o unen a la estructura de polipéptidos. La estructura de polipéptidos puede adoptar
5 diversas formas diferentes. Por ejemplo, puede ser, o comprender, el marco de un anticuerpo de origen natural, o fragmento o variante de este, o puede ser completamente sintético en la naturaleza. A continuación se describen adicionalmente ejemplos de diversas estructuras de polipéptidos.

En determinadas realizaciones, la estructura de polipéptidos de las proteínas de unión
10 a antígenos es un anticuerpo o deriva de un anticuerpo, incluso, entre otros, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos del dominio, anticuerpos sintéticos (a veces denominados aquí "anticuerpos miméticos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, fusiones de anticuerpos (a veces denominados aquí "conjugados de anticuerpos") y porciones o fragmentos de cada uno,
15 respectivamente. En algunos casos, la proteína de unión a antígenos es un fragmento inmunológico de un anticuerpo (p. ej., un Fab, un Fab', un F(ab')₂ o un scFv). En el presente se describen y definen adicionalmente las diversas estructuras.

Algunas de las proteínas de unión a antígenos como se proporcionan aquí se unen específicamente y/o selectivamente a PCSK9 humana. En algunas realizaciones, la proteína de
20 unión a antígenos se une específicamente y/o selectivamente a la proteína PCSK9 humana que tiene y/o consiste en residuos 153-692 de SEC. ID. N.º: 3. En algunas realizaciones, la ABP se une específicamente y/o selectivamente a PCSK9 humana que tiene y/o consiste en residuos 31-152 de SEC. ID. N.º: 3. En algunas realizaciones, la ABP se une selectivamente a una proteína PCSK9 humana como se ilustra en la figura 1A (SEC. ID. N.º: 1). En algunas
25 realizaciones, la proteína de unión a antígenos se une específicamente a al menos un fragmento de la proteína PCSK9 y/o una proteína PCSK9 completa, con o sin una secuencia señal.

En realizaciones en donde la proteína de unión a antígenos se utiliza para aplicaciones terapéuticas, una proteína de unión a antígenos puede inhibir, interferir o modular una o más
30 actividades biológicas de PCSK9. En una realización, una proteína de unión a antígenos se une específicamente a PCSK9 humana y/o inhibe sustancialmente la unión de PCSK9 humana con LDLR en al menos aproximadamente el 20 %-40 %, el 40-60 %, el 60-80 %, el 80-85 % o más (por ejemplo, midiendo la unión en un ensayo de unión competitiva *in vitro*). Algunas de las proteínas de unión a antígenos que se proporcionan aquí son anticuerpos. En algunas

realizaciones, la ABP tiene una K_d menor que (unión más firme) 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} M. En algunas realizaciones, la ABP tiene una IC_{50} para bloquear la unión de LDLR con PCSK9 (D374Y, variante de alta afinidad) menor que 1 microM, de 1000 nM a 100 nM, de 100 nM a 10 nM, de 10 nM a 1 nM, de 1000 pM a 500 pM, de 500 pM a 200 pM, menor que
5 200 pM, de 200 pM a 150 pM, de 200 pM a 100 pM, de 100 pM a 10 pM, de 10 pM a 1 pM.

Un ejemplo de un dominio constante de cadena pasada IgG2 de un anticuerpo anti-PCSK9 de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC. ID. N.º: 154, figura 3KK.

Un ejemplo de un dominio constante de cadena pasada IgG4 de un anticuerpo anti-
10 PCSK9 de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC. ID. N.º: 155, figura 3KK.

Un ejemplo de un dominio constante de cadena ligera kappa de un anticuerpo anti-PCSK9 tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC. ID. N.º: 157, figura 3KK.

Un ejemplo de un dominio constante de cadena ligera lambda de un anticuerpo anti-
15 PCSK9 tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC. ID. N.º: 156, figura 3KK.

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

En el presente se proporcionan diversas regiones variables de cadena pesada y de
30 cadena ligera y se ilustran en las figuras 2A-3JJ y 3LL-3BBB. En algunas realizaciones, cada una de estas regiones variables se pueden unir a las regiones constantes de cadena pesada y de cadena ligera anteriores para formar una cadena de anticuerpo completa de pesada y ligera, respectivamente. Además, cada una de las secuencias de cadena pesada y ligera generadas de esta forma se puede combinar para formar una estructura de anticuerpo completa.

En la tabla 2 se resumen los ejemplos específicos de algunas de las regiones variables de las cadenas ligera y pasada de los anticuerpos que se proporcionan y sus secuencias de aminoácidos correspondientes.

TABLA 2: Regiones variables de cadena pesada y ligera ejemplares

Anticuerpo	Ligera/pesada SEC. ID. N.º:
30A4	5/74
3C4	7/85
23B5	9/71
25G4	10/72
31H4	12/67
27B2	13/87
25A7	15/58
27H5	16/52
26H5	17/51
31D1	18/53
20D10	19/48
27E7	20/54
30B9	21/55
19H9	22/56
26E10	23/49
21B12	23/49
17C2	24/57
23G1	26/50
13H1	28/91
9C9	30/64
9H6	31/62
31A4	32/89
1A12	33/65
16F12	35/79
22E2	36/80
27A6	37/76
28B12	38/77
28D6	39/78
31G11	40/83
13B5	42/69
31B12	44/81
3B6	46/60
5H5	421/419
24F7	425/423
22B11	429/427
30F1	433/431
24B9.1	437/435
24B9.2	441/439
20A5.1	445/443
20A5.2	449/447
20E5.1	453/451
20E5.2	457/455
8A3	461/459
11F1	465/463
12H11	469/467
11H4	473/471
11H8	477/475
11G1	481/479
8A1	485/483

Nuevamente, cada una de las cadenas pesadas variables ejemplares enumeradas en la tabla 2 se pueden combinar con cualquiera de las cadenas ligeras variables ejemplares que se muestran en la tabla 2 para formar un anticuerpo. La tabla 2 muestra pares de cadena ligera y pesada ejemplares que se encuentran en varios de los anticuerpos divulgados aquí. En algunos casos, los anticuerpos incluyen al menos una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de las de las enumeradas en la tabla 2. En otros casos, los anticuerpos contienen dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Como ejemplo, un anticuerpo o proteína de unión a antígenos puede incluir una cadena pasada y una cadena ligera, dos cadenas pesadas o dos cadenas ligeras. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos comprende (y/o consiste) 1, 2 y/o 3 CDR pesadas y/o ligeras de al menos una de las secuencias enumeradas en la tabla 2 (las CDR para las secuencias están indicadas en las figuras 2A-3D y otras realizaciones en las figuras 3CCC-3JJJ y 15A-15D). En algunas realizaciones, todas las 6 CDR (CDR1-3 de la ligera (CDRL1, CDRL2, CDRL3) y CDR1-3 de la pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3)) son parte de la ABP. En algunas realizaciones, 1, 2, 3, 4, 5 o más CDR se incluyen en la ABP. En algunas realizaciones, una CDR pesada y una ligera de las CDR en las secuencias en la tabla 2 se incluyen en la ABP (las CDR para las secuencias en la tabla 2 están indicadas en las figuras 2A-3D). En algunas realizaciones, también se incluyen secciones adicionales (p. ej., como se ilustra en la figura 2A-2D, 3A-3D y otras realizaciones en 3CCC-3JJJ y 15A-15D) en la ABP. En las figuras 2A-3D (y otras realizaciones en las figuras 3CCC-3JJJ y 15A-15D) se indican ejemplos de CDR y FR para las cadenas pesada y ligera detalladas en la tabla 2. Se pueden seleccionar secuencias variables de cadena ligera opcionales (incluso CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3 y FR4) de las siguientes: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44, 46, 421, 425, 429, 433, 437, 441, 445, 449, 453, 457, 461, 465, 469, 473, 477, 481 y 485. Se pueden seleccionar secuencias variables de cadena pesada opcionales (incluso CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3 y FR4) de las siguientes: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81, 60, 419, 423, 427, 431, 435, 439, 443, 447, 451, 455, 459, 463, 467, 471, 475, 479 y 483. En algunos de los registros en la figura 2A-3D, se identifican variaciones de las secuencias o límites alternativos de las CDR y FR. Estas alternativas se identifican con "v1" luego del nombre de ABP. Como la mayoría de estas alternativas son leves en la naturaleza, en la tabla se muestran solamente las secciones con diferencias. Se entenderá que la sección restante de la cadena ligera o pesada es la misma que se muestra para la ABP base en los otros paneles. Por lo tanto, por ejemplo, 19H9v1 en la figura 2C tiene la misma FR1, CDR1 y FR2 que 19H9 en la figura 2A ya que la única diferencia

se indica en la figura 2C. Para tres de las secuencias de ácidos nucleicos (ABP 26E10, 30B9 y 31B12), en las figuras se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos alternativas adicionales. Como apreciará el entendido en la técnica, en realidad no necesitan utilizar más de una de tales secuencias en la creación de un anticuerpo o ABP. De hecho, en algunas realizaciones, es necesario que esté presente solamente uno o ninguno de los dos ácidos nucleicos de la cadena pesada o ligera específica.

En algunas realizaciones, la ABP se codifica por una secuencia de ácidos nucleicos que puede codificar cualquiera de las secuencias de la proteína en la tabla 2.

En algunas realizaciones, la ABP se une selectivamente a la forma de PCSK9 que se une a LDLR (p. ej., la forma autocatalizada de la molécula). En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos no se une al extremo carboxilo terminal del dominio catalítico (p. ej., 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, la mayoría de los aminoácidos en el extremo carboxilo terminal). En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos no se une al extremo amino terminal del dominio catalítico (p. ej., 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, la mayoría de los aminoácidos en el extremo amino terminal). En algunas realizaciones, la ABP se une a los aminoácidos dentro de los aminoácidos 1-100 de la forma madura de PCSK9. En algunas realizaciones, la ABP se une a los aminoácidos dentro (y/o las secuencias de aminoácidos que consisten en estos) aminoácidos 31-100, 100-200, 31-152, 153-692, 200-300, 300-400, 452-683, 400-500, 500-600, 31-692, 31-449 y/o 600-692. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico. En algunas realizaciones, la ABP neutralizante y/o no neutralizante se une al prodominio. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico y al prodominio. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico para obstruir un área en el dominio catalítico que interactúa con el prodominio. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico en una ubicación o superficie con la que el prodominio interactúa tal como se indica en Piper y col. (Structure 15: 1-8 (2007), cuya totalidad se incorpora en el presente por referencia, incluso las representaciones estructurales). En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico y restringe la movilidad del prodominio. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico sin unirse al prodominio. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico sin unirse al prodominio, mientras evita que el prodominio se reoriente para permitir que PCSK9 se una a LDLR. En algunas realizaciones, la ABP se une al mismo epítipo que los residuos circundantes 149-152 del prodominio en Piper y col. En algunas realizaciones, las ABP se unen la ranura (como se indica en Piper y col.) en el dominio V. En algunas realizaciones, las ABP se unen a la parte rica en histidina próxima a la ranura en el dominio V. En algunas realizaciones, dichos

anticuerpos (que se unen al dominio V) no son neutralizantes. En algunas realizaciones, los anticuerpos que se unen al dominio V son neutralizantes. En algunas realizaciones, las ABP neutralizantes evitan la unión de PCSK9 con LDLR. En algunas realizaciones, las ABP neutralizantes, aunque evitan la degradación de PCSK9 de LDLR, no evitan la unión de PCSK9 con LDLR (por ejemplo ABP 31A4). En algunas realizaciones, la ABP se une o bloquea al menos una de las histidinas ilustradas en la figura 4 del documento Piper y col. En algunas realizaciones, la ABP bloquea la tríada catalítica en PCSK9.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une selectivamente a proteínas PCSK9 variantes, p. ej., D374Y sobre PCSK9 natural. En algunas realizaciones, estos anticuerpos se unen a la variante al menos dos veces tan fuerte como la natural y, preferentemente, 2-5, 5-10, 10-100, 100-1000, 1000-10.000 veces o más al mutante que la natural (según lo medido mediante una K_d). En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibe selectivamente la interacción de D374Y PCSK9 variante con LDLR sobre la capacidad de PCSK9 natural de interactuar con LDLR. En algunas realizaciones, estos anticuerpos bloquean la capacidad de la variante de unirse a LDLR de manera más fuerte que la capacidad de la natural, p. ej., al menos dos veces tan fuerte como la natural y, preferentemente, 2-5, 5-10, 10-100, 100-1000 veces o más al mutante que la natural (según lo medido mediante una IC_{50}). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une y neutraliza las formas variante y PCSK9 natural de PCSK9, por ejemplo D374Y en niveles similares. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a PCSK9 para evitar que las variante de LDLR se unan a PCSK9. En algunas realizaciones, las variantes de LDLR son al menos el 50 % idénticas al LDLR humano. Cabe destacar que los entendidos en la técnica conocen las variantes de LDLR (p. ej., Brown MS y col., "Calcium cages, acid baths and recycling receptors" Nature 388: 629-630, 1997). En algunas realizaciones, la ABP puede elevar el nivel de LDLR eficaz en hipercolesterolemia familiar heterocigótica (cuando una variante de pérdida de función de LDLR está presente).

En algunas realizaciones, la ABP se une a (pero no bloquea) las variantes de PCSK9 que tienen un porcentaje de identidad de al menos el 50 %, el 50-60, el 60-70, el 70-80, el 80-90, el 90-95, el 95-99 o mayor con al forma de PCSK9 ilustrada en la figura 1A y/o figura 1B. En algunas realizaciones, la ABP se une a (pero no bloquea) las variantes de PCSK9 que tienen un porcentaje de identidad de al menos el 50 %, el 50-60, el 60-70, el 70-80, el 80-90, el 90-95, el 95-99 o mayor con al forma madura de PCSK9 ilustrada en la figura 1A y/o figura 1B. En algunas realizaciones, la ABP se une y evita que las variantes de PCSK9 que tienen un porcentaje de identidad de al menos el 50 %, el 50-60, el 60-70, el 70-80, el 80-90, el 90-95, el 95-99 o mayor con la forma de PCSK9 ilustrada en la figura 1A y/o figura 1B interactúen con

LDLR. En algunas realizaciones, la ABP se une y evita que las variantes de PCSK9 que tienen un porcentaje de identidad de al menos el 50 %, el 50-60, el 60-70, el 70-80, el 80-90, el 90-95, el 95-99 o mayor con la forma madura de PCSK9 ilustrada en la figura 1B interactúen con LDLR. En algunas realizaciones, la variante de PCSK9 es una variante humana, por ejemplo
5 variantes en la posición 474, E620G y/o E670G. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 474 es valina (como en otros seres humanos) o treonina (como en cyno y ratón). Considerando los datos de reactividad cruzada presentados en el presente, se cree que los anticuerpos presentes se unirán fácilmente a las variantes anteriores.

En algunas realizaciones, la ABP se une a un epítipo unido mediante uno de los
10 anticuerpos descritos en la tabla 2. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos se unen a un estado conformacional específico de PCSK9 para evitar que PCSK9 interactúe con LDLR.

Proteínas de unión a antígenos humanizadas (p. ej., anticuerpos)

Según se describe aquí, una proteína de unión a antígenos para PCSK9 puede
15 comprender un anticuerpo humanizado y/o parte de este. Una aplicación práctica importante de tal estrategia es la "humanización" del sistema inmune humoral del ratón.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado es sustancialmente no inmunogénico en seres humanos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado tiene sustancialmente la misma afinidad por una diana que un anticuerpo de otra especie de la
20 cual deriva el anticuerpo humanizado. Véase, p. ej., la patente estadounidense 5.530.101, la patente estadounidense 5.693.761; la patente estadounidense 5.693.762; la patente estadounidense 5.585.089.

En determinadas realizaciones, se identifican los aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo que se puede modificar sin disminuir la afinidad nativa del dominio de unión a
25 antígenos mientras reducen su inmunogenicidad. Véase, p. ej., las patentes estadounidenses N.º 5.766.886 y 5.869.619.

En determinadas realizaciones, la modificación de un anticuerpo a través de métodos conocidos en la técnica está típicamente diseñada para lograr una mayor afinidad de unión para una diana y/o para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo en el recipiente. En determinadas
30 realizaciones, se modifican los anticuerpos humanizados para eliminar sitios de glicosilación a fin de aumentar la afinidad del anticuerpo para su antígeno cognado. Véase, p. ej., Co y col., *Mol. Immunol.*, 30: 1361-1367 (1993). En determinadas realizaciones, se utilizan técnicas tales como "remodelación", "hiperquimerización" o "revestimiento/recubrimiento" para producir anticuerpos humanizados. Véase, p. ej., Vaswami y col., *Annals of Allergy, Asthma, & Immunol.*

81: 105 (1998); Roguska y col., *Prot. Engineer.*, 9: 895-904 (1996); y la patente estadounidense N.º 6.072.035. En ciertas de dichas realizaciones, dichas técnicas típicamente reducen la inmunogenicidad del anticuerpo mediante la reducción del número de residuos extraños, pero no impiden las respuestas anti-idiotípicas y anti-alotípicas luego de la administración repetida de los anticuerpos. Se describen otros métodos determinados para reducir la inmunogenicidad, p. ej., en Gilliland y col., *J. Immunol.*, 62(6): 3663-71 (1999).

En determinados casos, humanizar anticuerpos produce una pérdida de capacidad de unión a antígenos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos humanizados se "mutan nuevamente". En ciertas de dichas realizaciones, el anticuerpo humanizado se muta para incluir uno o más de los residuos de aminoácidos que se encuentran en el anticuerpo donante. Véase, p. ej., Saldanha y col., *Mol Immunol* 36: 709-19 (1999).

En determinadas realizaciones, se pueden injertar regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo para PCSK9 a las regiones marco (FR) de la misma especie o de otra especie. En determinadas realizaciones, se pueden injertar CDR de las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo para PCSK9 a las FR humanas de consenso. Para crear FR humanas de consenso, en determinadas realizaciones, se alinean FR de varias secuencias de aminoácidos de cadena pesada o cadena ligera humanas para identificar una secuencia de aminoácidos de consenso. En determinadas realizaciones, se reemplazan las FR de un anticuerpo para la cadena pesada o la cadena ligera de PCSK9 por las FR de una cadena pesada o cadena ligera diferente. En determinadas realizaciones, los aminoácidos poco comunes en las FR de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo para PCSK9 no se reemplazan, mientras el resto de los aminoácidos de FR se reemplazan. Los aminoácidos poco comunes son aminoácidos específicos que se encuentran en posiciones en las cuales usualmente no se encuentran en FR. En determinadas realizaciones, se pueden utilizar las regiones variables injertadas de un anticuerpo para PCSK9 con una región constante que es diferente de la región constante de un anticuerpo para PCSK9. En determinadas realizaciones, las regiones variables injertadas son parte de un anticuerpo de Fv de cadena única. El injerto de CDR se describe, p. ej., en las patentes estadounidenses N.º 6.180.370, 6.054.297, 5.693.762, 5.859.205, 5.693.761, 5.565.332, 5.585.089 y 5.530.101 y en Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239: 1534-1536 (1988), Winter, *FEBS Letts.*, 430: 92-94 (1998), que se incorporan en el presente por referencia para cualquier fin.

Proteínas de unión a antígenos humanas (p. ej., anticuerpos)

Según se describe aquí, una proteína de unión a antígenos que se une a PCSK9 puede comprender un anticuerpo humano (es decir, completamente humano) y/o parte de este. En determinadas realizaciones, se proporcionan secuencias de nucleótidos que codifican y las secuencias de aminoácidos que comprenden, moléculas de inmunoglobulina de cadena pasada y ligera, particularmente las secuencias que corresponden a las regiones variables. En determinadas realizaciones, se proporcionan las secuencias correspondientes a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), específicamente de CDR1 a CDR3. De acuerdo con determinadas realizaciones, se proporciona una línea de células de hibridoma que expresa dicha molécula de inmunoglobulina. De acuerdo con determinadas realizaciones, se proporciona una línea de células de hibridoma que expresa dicho anticuerpo monoclonal. En determinadas realizaciones, se selecciona una línea de células de hibridoma de al menos una de las líneas celulares descritas en la tabla 2, p. ej., 21B12, 16F12 y 31H4. En determinadas realizaciones, se proporciona un anticuerpo monoclonal humano purificado para PCSK9 humana.

Se pueden diseñar cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos en ratón con grandes fragmentos de loci Ig humano en previsión de que dicho ratón producirá anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los grandes fragmentos de Ig humano pueden preservar la gran diversidad genética variable así como la regulación adecuada de la producción y expresión de anticuerpos. Al explotar la maquinaria del ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a las proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducidos en esas cepas de ratón puede producir anticuerpos completamente humanos con alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluso antígenos humanos. Utilizando la tecnología de hibridomas, se pueden producir y seleccionar Mab humanos específicos de antígenos con la especificidad deseada. Determinados métodos ejemplares se describen en WO 98/24893, patente estadounidense N.º 5.545.807, EP 546073 y EP 546073.

En determinadas realizaciones, se pueden utilizar regiones constantes de especies diferentes a los seres humanos junto con las regiones variables humanas.

La capacidad de clonar y reconstruir loci humanos de tamaño de megabases en cromosomas artificiales de levadura (YAC) y para introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona un enfoque para elucidar los componentes funcionales de loci muy largos o crudamente mapeados así como generar modelos útiles de enfermedad humana. Además, la utilización de dicha tecnología para la sustitución de loci de ratón con sus equivalentes humanos podría proporcionar percepciones en la expresión y regulación de productos genéticos

humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas y su participación en la inducción y progresión de enfermedades.

Los anticuerpos humanos evitan algunos de los problemas asociados a los anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes murinas o de rata. La presencia de dichas proteínas murinas o derivadas de rata puede conducir a la rápida eliminación de los anticuerpos o puede dar lugar a la generación de una respuesta inmune contra el anticuerpo por un paciente. Para evitar la utilización de anticuerpos murinos o derivados de rata, se pueden generar anticuerpos completamente humanos a través de la introducción de loci de anticuerpo humano funcional en un roedor, otro mamífero o animal de modo que el roedor, otro mamífero o animal produce anticuerpos completamente humanos.

Los anticuerpos humanizados son los anticuerpos que han reemplazado, aunque comienzan inicialmente con secuencias de aminoácidos de anticuerpos que no son humanos, al menos algunas de estas secuencias de aminoácidos de anticuerpos no humanos por secuencias de anticuerpos humanos. Esto contrasta con los anticuerpos humanos, en los cuales el anticuerpo se codifica (o se puede codificar) por genes que poseían un ser humano.

Variantes de proteínas de unión a antígenos

Otros anticuerpos que se proporcionan son variantes de las ABP enumeradas anteriormente formadas por combinación o subpartes de las cadenas variable pesada y variable ligera que se muestran en la tabla 2 y comprenden cadenas variable ligera y/o variable pesada que tienen, cada una, una identidad de al menos el 50 %, el 50-60 %, el 60-70 %, el 70-80 %, el 80-85 %, el 85-90 %, el 90-95 %, el 95-97 %, el 97-99 % o más del 99 % con las secuencias de aminoácidos de las secuencias en la tabla 2 (ya sea la secuencia entera o una subparte de la secuencia, p. ej., una o más CDR). En algunos casos, dichos anticuerpos incluyen al menos una cadena pesada y una cadena ligera, mientras en otros casos las formas variantes contienen dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas (o subpartes de estas). En algunas realizaciones, se puede utilizar la comparación de secuencias en la figura 2A-3D (y 13A-13J, otras realizaciones en 15A-15D y las figuras 48A y 48B) para identificar las secciones de los anticuerpos que se pueden modificar mediante la observación de las variaciones que impactan en la unión y las variaciones que no parecen impactar en la unión. Por ejemplo, al comparar secuencias similares, se pueden identificar las secciones (p. ej., aminoácidos particulares) que se pueden modificar y cómo se pueden modificar y seguir reteniendo (o mejorando) la funcionalidad de la ABP. En algunas realizaciones, las variantes de ABP incluyen los grupos y las secuencias de consenso ilustrados en las figuras 13A, 13C, 13F, 13G, 13H, 13I, 13J y/o 48A y 48B y las variaciones están permitidas en las posiciones

identificadas como variables en las figuras. Se definieron las CDR que se muestran en las figuras 13A, 13C, 13F, 13G, 48A y 48B en función de una combinación híbrida del método de Chothia (en base a la ubicación de las regiones bucle estructurales, véase, p. ej., "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins," Bissan Al-Lazikani, Arthur M. Lesk y Cyrus Chothia, *Journal of Molecular Biology*, 273(4): 927-948, 7 de noviembre (1997)) y el método de Kabat (en base a la variabilidad de secuencia, véase, p. ej., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición. NIH publicación N.º 91-3242, Kabat y col., (1991)). Cada residuo determinado por cualquiera de los métodos, se incluyó en la lista final de residuos de CDR (y se presentó en las figuras 13A, 13C, 13F, 13G, 48A y 48B). Las CDR en las figuras 13H, 13I y 13J se obtuvieron solamente a través del método de Kabat. A menos que se especifique lo contrario, las secuencias de consenso definidas, las CDR y las FR en las figuras 13H-13J definirán y controlarán las CDR y las FR indicadas para las ABP mencionadas en la figura 13.

En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígenos comprende una cadena pasada que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada de al menos una de las secuencias de SEC. ID. N.º: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 y 60. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígenos comprende una cadena pasada que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada de al menos una de las secuencias de SEC. ID. N.º: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 y 60. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígenos comprende una cadena pasada que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada de al menos una de las secuencias de SEC. ID. N.º: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 y 60.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos comprende una secuencia que es al menos el 90 %, el 90-95 % y/o el 95-99 % idéntica a una o más de las CDR de las CDR en al menos una de las secuencias de SEC. ID. N.º: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 y 60. En algunas realizaciones, hay presente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR (cada una al menos el 90 %, el 90-95 % y/o el 95-99 % idéntica a las secuencias anteriores).

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos comprende una secuencia

que es al menos el 90 %, el 90-95 % y/o el 95-99 % idéntica a una o más de las FR de las FR en al menos una de las secuencias de SEC. ID. N.º: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 y 60. En algunas realizaciones, hay presente 1, 2, 3 o 4 FR (cada una al menos el 90 %, el 90-95 % y/o el 95-99 % idéntica a las secuencias anteriores).

En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígenos comprende una cadena ligera que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada de al menos una de las secuencias de SEC. ID. N.º: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 y 46. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígenos comprende una cadena ligera que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada de al menos una de las secuencias de SEC. ID. N.º: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 y 46. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígenos comprende una cadena ligera que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de al menos una de las secuencias de SEC. ID. N.º: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 y 46.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos comprende una secuencia que es al menos el 90 %, el 90-95 % y/o el 95-99 % idéntica a una o más CDR de las CDR en al menos una de las secuencias de SEC. ID. N.º: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 y 46. En algunas realizaciones, hay presente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR (cada una al menos el 90 %, el 90-95 % y/o el 95-99 % idéntica a las secuencias anteriores).

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos comprende una secuencia que es al menos el 90 %, el 90-95 % y/o el 95-99 % idéntica a una o más FR de las FR en al menos una de las secuencias de SEC. ID. N.º: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 y 46. En algunas realizaciones, hay presente 1, 2, 3 o 4 FR (cada una al menos el 90 %, el 90-95 % y/o el 95-99 % idéntica a las secuencias anteriores).

A la luz de la presente divulgación, un entendido en la técnica podrá determinar variantes adecuadas de las ABP como se establece aquí utilizando técnicas conocidas. En determinadas realizaciones, el entendido en la técnica puede identificar áreas adecuadas de la

molécula que se pueden modificar sin destruir la actividad, dirigiéndose a regiones que se crea que no son importantes para la actividad. En determinadas realizaciones, se pueden identificar residuos y porciones de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. En determinadas realizaciones, incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones de aminoácidos conservadoras sin destruir la actividad biológica o sin afectar negativamente la estructura del polipéptido.

Además, el entendido en la técnica puede revisar estudios de estructura-función que identifiquen residuos en polipéptidos similares importantes para la actividad o la estructura. Considerando dicha comparación, se puede predecir la importancia de los residuos de aminoácidos en una proteína que corresponden a los residuos de aminoácidos que son importantes para la actividad o la estructura en proteínas similares. El entendido en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos similares desde el punto de vista químico para dichos residuos de aminoácidos que se prevé que son importantes.

El entendido en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos con relación a esa estructura en ABP similares. Considerando dicha información, el entendido en la técnica puede predecir el alineamiento de los residuos de aminoácidos de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. En determinadas realizaciones, el entendido en la técnica puede elegir no realizar cambios radicales a los residuos de aminoácidos que se prevé que están en la superficie de la proteína, ya que dichos residuos pueden estar involucrados en interacciones importantes con otras moléculas. Por otra parte, el entendido en la técnica puede generar variantes de prueba que contienen una sola sustitución de aminoácido en cada residuo de aminoácidos deseado. Luego, las variantes se pueden evaluar utilizando ensayos de actividad conocidos por los entendidos en la técnica. Dichas variantes se pueden utilizar para reunir información acerca de las variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubrió que un cambio a un residuo de aminoácido particular produjo una actividad destruida, indeseablemente reducida o no adecuada, las variantes con dicho cambio se puede evitar. En otras palabras, según la información reunida de dichos experimentos de rutina, el entendido en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos cuando se deben evitar las sustituciones adicionales, ya sea solos o en combinación con otras mutaciones.

Diversas publicaciones científicas se han dedicado a la predicción de una estructura secundaria. Véase Moulton J., Curr. Op. en Biotech., 7(4): 422-427 (1996), Chou y col., Biochemistry, 13(2): 222-245 (1974); Chou y col., Biochemistry, 113(2): 211-222 (1974); Chou y col., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47: 45-148 (1978); Chou y col., Ann. Rev. Biochem., 47: 251-276 y Chou y col., Biophys. J., 26: 367-384 (1979). Por otra parte, actualmente hay

disponibles programas informáticos para ayudar con la predicción de la estructura secundaria. Un método para la predicción de la estructura secundaria se basa en modelado por homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia mayor que el 30 %, o similitud mayor que el 40 % suelen tener topologías estructurales similares. El crecimiento reciente de la base de datos estructural de proteínas (PDB) ha proporcionado predictibilidad potenciada de estructura secundaria, incluso el posible número de veces dentro de la estructura de un polipéptido o proteína. Véase Holm y col., Nucl. Acid. Res., 27(1): 244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner y col., Curr. Op. Struct. Biol., 7(3): 369-376 (1997)) que tres es un número limitado de veces en un determinado polipéptido o proteína y que una vez que se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural será considerablemente más precisa.

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

En determinadas realizaciones, las variantes de la proteína de unión a antígenos incluyen variantes de glicosilación en donde se ha alterado el número y/o tipo de sitio de glicosilación en comparación con las secuencias de aminoácidos de un polipéptido original. En determinadas realizaciones, las variantes de la proteína comprenden un número mayor o menor de sitios de glicosilación unidos a N que la proteína nativa. Un sitio de glicosilación unido a N se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en donde el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución de residuos de aminoácidos para crear esta secuencia proporciona un sitio nuevo potencial para la adición de una cadena de carbohidrato unida a N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan esta secuencia eliminarán una cadena de carbohidrato unida a N existente. También se proporciona un reordenamiento de cadenas de carbohidratos unidas a N en donde se eliminan uno o más sitios de glicosilación unidos a N (típicamente los que son de origen natural) y se crean uno o más sitios unidos a N nuevos. Las variantes anticuerpo preferidas adicionales incluyen variantes de cisteína en donde se eliminan o sustituyen uno o más residuos de cisteína por otro aminoácido (p. ej., serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos original. Las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando los anticuerpos se deben replegar en una conformación biológicamente activa, por ejemplo luego del aislamiento de cuerpos de inclusión

insolubles. Las variantes de cisteína generalmente tienen menos residuos de cisteína que la proteína nativa y, típicamente, tienen un número par para minimizar las interacciones que provienen de las cisteínas no apareadas.

De acuerdo con determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son las que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alteran las afinidades de unión y/o (4) confieren u modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales en dichos polipéptidos. De acuerdo con determinadas realizaciones, se pueden realizar una o múltiples sustituciones de aminoácidos (en determinadas realizaciones, sustituciones de aminoácidos conservadoras) en la secuencia de origen natural (en determinadas realizaciones, en la porción del polipéptido fuera de los dominios que forma contactos intermoleculares). En determinadas realizaciones, es posible que una sustitución de aminoácidos conservadora típicamente no cambie sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (p. ej., un aminoácido de reemplazo no tenderá a quebrar una hélice que se produce en la secuencia original, o alterará otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia original). Ejemplos de estructuras de polipéptidos secundarias y terciarias reconocidas en la técnica se describe en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden & J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton y col., *Nature*, 354: 105 (1991), que se incorporan en el presente por referencia.

En algunas realizaciones, las variantes son variantes de secuencias de ácidos nucleicos de las ABP divulgadas aquí. El entendido en la técnica apreciará que se puede utilizar el análisis anterior para identificar, evaluar y crear variantes de proteína ABP y también para secuencias de ácidos nucleicos que pueden codificar para esas variantes de proteína. Por lo tanto, se contemplan las secuencias de ácidos nucleicos que pueden codificar para esas variantes (así como las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para las ABP en la tabla 2, pero son diferentes de las divulgadas explícitamente en el presente). Por ejemplo, una variante de ABP puede tener una identidad de al menos el 80, el 80-85, el 85-90, el 90-95, el 95-97, el 97-99 o mayor con al menos una secuencia de ácidos nucleicos descrita en SEC. ID. N.º: 152, 153, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151 o al menos entre una y seis (y diversas combinaciones de estas) de las CDR codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos en SEC. ID. N.º: 152, 153, 92, 93, 94, 95,

96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 y 151.

En algunas realizaciones, el anticuerpo (o secuencia de ácidos nucleicos que lo codifica) es una variante si la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la ABP particular (o la secuencia de ácidos nucleicos en sí) puede hibridarse selectivamente con cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas en la tabla 2 (por ejemplo, entre otros, SEC. ID. N.º: 152, 153, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 y 151) en condiciones estrictas. En una realización, condiciones moderadamente estrictas adecuadas incluyen el prelavado en una solución de 5X de SSC; el 0,5 % de SDS, 1,0 mM de EDTA (pH 8: 0); hibridar a 50 °C, -65 °C, 5x de SSC, durante la noche o, en el caso de homología entre especies, a 45 °C con 0,5x de SSC; seguido de lavado doble a 65 °C durante 20 minutos con cada uno de 2x, 0,5x y 0,2x de SSC que contiene el 0,1 % de SDS. Dichas secuencias de ADN de hibridación también se encuentran dentro del alcance de la presente invención, como las secuencias de nucleótidos que, debido a la degradación del código, codifican un polipéptido de anticuerpo que se codifica por una secuencia de ADN de hibridación y las secuencias de aminoácidos que se codifican por esas secuencias de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, las variantes de CDR incluyen secuencias de ácidos nucleicos y las secuencias de aminoácidos codificadas por esas secuencias, que se hibridan con una o más de las CDR dentro de las secuencias indicadas anteriormente (las CDR individuales se pueden determinar fácilmente a la luz de las figuras 2A-3D y otras realizaciones en las figuras 3CCC-3JJJ y 15A-15D). La frase "hibridar selectivamente" mencionado en este contexto significa unir de forma detectable y selectiva. Los polinucleótidos, los oligonucleótidos y fragmentos de estos de acuerdo con la invención se hibridan selectivamente con cadenas de ácidos nucleicos en condiciones de hibridación y lavado que minimizan las cantidades apreciables de unión detectable con ácidos nucleicos no específicos. Se pueden utilizar condiciones de alta rigurosidad para lograr las condiciones de hibridación selectivas como se conocen en la técnica y se plantean en el presente. Generalmente, la homología de secuencias de ácidos nucleicos entre los polinucleótidos, los oligonucleótidos y los fragmentos de la invención y una secuencia de ácidos nucleicos de interés serán al menos el 80 % y, más típicamente, con homologías preferiblemente crecientes de al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 99 % y el 100 %. Dos secuencias de aminoácidos son

homólogas si existe una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, el 85 % de homología significa que el 85 % de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias se alinean para lograr coincidencia máxima. Los espacios (en cualquiera de las dos secuencias que se emparejan) están permitidos para maximizar la coincidencia; las longitudes de los espacios se prefieren de 5 o menos y, más preferentemente, de 2 o menos. Alternativamente y preferentemente, dos secuencias de proteína (o secuencias de polipéptidos derivadas de ellas de al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, según este término se emplea aquí, si tienen una puntuación de alineación de más de 5 (en unidades de desviación estándar) utilizando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización por espacios de 6 o mayor. Véase Dayhoff, M. O., en Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 101-110 (Volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y Suplemento 2 de este volumen, pp. 1-10. Las dos secuencias o partes de estas son más preferentemente homólogas si sus aminoácidos son mayores o iguales que el 50 % de identidad cuando se alienan óptimamente utilizando el programa ALIGN. El término "corresponde a" se utiliza aquí para significar que una secuencia de polinucleótidos es homóloga (es decir, es idéntica, no estrictamente relacionada evolutivamente) a toda o a una porción de una secuencia de polinucleótidos de referencia, o que una secuencia de polipéptidos es idéntica a una secuencia de polipéptidos de referencia. En contraposición, el término "complementario a" se utiliza aquí para significar que la secuencia complementaria es homóloga a toda o a una porción de una secuencia de polinucleótidos de referencia. Para ilustración, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a la secuencia de referencia "GTATA".

Preparación de proteínas de unión a antígenos (p. ej., anticuerpos)

En determinadas realizaciones, se producen proteínas de unión a antígenos (por ejemplo anticuerpos) mediante la inmunización con un antígeno (p. ej., PCSK9). En determinadas realizaciones, los anticuerpos se pueden producir mediante la inmunización con PCSK9 completa, una forma soluble de PCSK9, el dominio catalítico solo, la forma madura de PCSK9 que se muestra en la figura 1A, una forma de variante de corte de PCSK9 o fragmentos de estos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden ser policlonales o monoclonales y/o pueden ser anticuerpos recombinantes. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención son anticuerpos humanos preparados, por ejemplo, por inmunización de animales transgénicos que pueden producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, la solicitud publicada de PCT N.º WO 93/12227).

En determinadas realizaciones, se pueden emplear determinadas estrategias para

manipular las propiedades inherentes de un anticuerpo, por ejemplo la afinidad de un anticuerpo para su diana. Dichas estrategias incluyen, entre otros, el uso de mutagénesis aleatoria o mutagénesis específica de sitio de la molécula de polinucleótido que codifica un anticuerpo para generar una variante de anticuerpo. En determinadas realizaciones, dicha generación es
5 seguida de la evaluación de las variantes de anticuerpo que presentan el cambio deseado, p. ej. afinidad aumentada o reducida.

En determinadas realizaciones, los residuos de aminoácidos diana en las estrategias mutagénicas son los que se encuentran en las CDR. En determinadas realizaciones, los aminoácidos en las regiones marco de los dominios variables son diana. En determinadas
10 realizaciones, se ha demostrado que dichas regiones marco contribuyen con las propiedades de unión a la diana de determinados anticuerpos. Véase, p. ej., Hudson, Curr. Opin. Biotech., 9: 395-402 (1999) y las referencias en él.

En determinadas realizaciones, se producen bibliotecas más pequeñas y examinadas más efectivamente de variantes de anticuerpo mediante la restricción de mutagénesis aleatoria
15 o mutagénesis dirigida al sitio para los sitios de hipermutación en las CDR, que son sitios que corresponden a zonas propensas a la mutación durante el proceso de maduración de la afinidad somática. Véase, p. ej., Chowdhury & Pastan, Nature Biotech., 17: 568-572 (1999) y las referencias en él. En determinadas realizaciones, se pueden utilizar determinados tipos de elementos de ADN para identificar los sitios de hipermutación que incluyen, entre otros,
20 determinadas repeticiones invertidas directas, determinadas secuencias de consenso, determinadas estructuras secundarias y determinados palíndromos. Por ejemplo, dichos elementos de ADN que se pueden utilizar para identificar los sitios de hipermutación incluyen, entre otros, una secuencia de bases tetra que comprende una purina (A o G), seguido de guanina (G), seguido de una pirimidina (C o T), seguido de adenosina o timidina (A o T) (es
25 decir, A/G-G-C/T-A/T). Otro ejemplo de elemento de ADN que se puede utilizar para identificar sitios de hipermutación es el codón de serina, A-G-C/T.

Preparación de ABP completamente humanas (p. ej., anticuerpos)

En determinadas realizaciones, se utiliza una técnica de expresión de fagos para generar anticuerpos monoclonales. En determinadas realizaciones, dichas técnicas producen
30 anticuerpos monoclonales completamente humanos. En determinadas realizaciones, un polinucleótido que codifica un único fragmento de anticuerpo Fab o Fv se expresa en la superficie de una partícula de fago. Véase, p. ej., Hoogenboom y col., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks y col., J Mol Biol 222: 581 (1991); patente estadounidense N.º 5.885.793. En determinadas realizaciones, el fago se "evalúa" para identificar los fragmentos de anticuerpo

que tienen afinidad para la diana. Por lo tanto, determinados de dichos procesos imitan la selección inmunitaria a través de la expresión de repertorios de fragmentos de anticuerpos en la superficie del bacteriófago filamentoso y posterior selección del fago a través de su unión a la diana. En determinados de dichos procedimientos, se aíslan fragmentos de anticuerpos neutralizantes funcionales de alta afinidad. En determinadas de dichas realizaciones (presentadas más detalladamente a continuación), se crea un repertorio completo de genes de anticuerpo humano mediante la clonación de genes V humanos reordenados naturalmente de linfocitos de sangre periférica. Véase, p. ej., Mullinax y col., *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 87: 8095-8099 (1990).

De acuerdo con determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención se preparan a través de la utilización de un ratón transgénico que tiene una porción sustancial del anticuerpo humano que produce genoma insertada pero que se vuelve deficiente en la producción de anticuerpos endógenos, murinos. Dichos ratones, luego, pueden producir anticuerpos y moléculas de inmunoglobulina humana y son deficientes en la producción de anticuerpos y moléculas de inmunoglobulina murina. Las tecnologías utilizadas para lograr este resultado se divulgan en las patentes, solicitudes y referencias divulgadas en la especificación en el presente. En determinadas realizaciones, se pueden emplear métodos tales como los divulgados en solicitud publicada de PCT N.º WO 98/24893 o en Mendez y col., *Nature Genetics*, 15: 146-156 (1997), que se incorporan en el presente por referencia para cualquier fin.

Generalmente, se pueden producir ABP monoclonales completamente humanas (p. ej., anticuerpos) específicas para PCSK9 de la siguiente manera. Se inmunizan ratones transgénicos que contienen inmunoglobulina humana con el antígeno de interés, p. ej. PCSK9 y se obtienen células linfáticas (por ejemplo células B) de los ratones que expresan anticuerpos. Dichas células recuperadas se fusionan con una línea celular de tipo mieloide para preparar líneas de células de hibridoma inmortal y se evalúan y seleccionan dichas líneas de células de hibridoma para identificar las líneas de células de hibridoma que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. En determinadas realizaciones, se proporciona la producción de una línea de células de hibridoma que produce anticuerpos específicos para PCSK9.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos completamente humanos se producen mediante la exposición de esplenocitos humanos (células B o T) a un antígeno *in vitro* y la posterior reconstitución de las células expuestas en un ratón inmunocomprometido, p. ej. SCID o nod/SCID. Véase, p. ej., Brams y col., *J. Immunol.* 160: 2051-2058 (1998); Carballido y col.,

Nat. Med., 6: 103-106 (2000). En determinadas de dichos enfoques, el injerto de tejido fetal humano en ratones SCID (SCID-hu) provoca la hematopoyesis a largo plazo y el desarrollo de células T humanas. Véase, p. ej., McCune y col., *Science*, 241: 1532-1639 (1988); Ifversen y col., *Sem. Immunol.*, 8: 243-248 (1996). En determinados casos, la respuesta inmunitaria humoral en dichos ratones quiméricos depende del codesarrollo de las células T humanas en los animales. Véase, p. ej., Martensson y col., *Immunol.*, 83: 1271-179 (1994). En determinados enfoques, se transplantan linfocitos de sangre periférica humana a ratones SCID. Véase, p. ej., Mosier y col., *Nature*, 335: 256-259 (1988). En ciertas de dichas realizaciones, cuando dichas células transplantadas se tratan con un agente cebador, por ejemplo enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA) o con anticuerpos monoclonales anti-CD40 humanos, se detectan mayores niveles de producción de células B. Véase, p. ej., Martensson y col., *Immunol.*, 84: 224-230 (1995); Murphy y col., *Blood*, 86: 1946-1953 (1995).

Por lo tanto, en determinadas realizaciones, los anticuerpos completamente humanos se pueden producir mediante la expresión de ADN recombinante en células huésped o mediante la expresión en las células de hibridoma. En otras realizaciones, los anticuerpos se pueden producir utilizando las técnicas de expresión de fagos descritas en el presente.

Los anticuerpos descritos en el presente se prepararon a través de la utilización de la tecnología XenoMouse®, como describe en el presente. Dichos ratones, luego, pueden producir anticuerpos y moléculas de inmunoglobulina humana y son deficientes en la producción de anticuerpos y moléculas de inmunoglobulina murina. Las tecnologías utilizadas para lograrlo se divulgan en las patentes, solicitudes y referencias divulgadas en la sección de antecedentes del presente. En particular, sin embargo, una realización preferida de producción transgénica de ratones y anticuerpos de ello se divulga en la solicitud de patente estadounidense N.º de serie 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996 y la solicitud de patente internacional N.º WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998 y WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente por referencia. Véase también Mendez y col., *Nature Genetics*, 15: 146-156 (1997), cuya divulgación se incorpora en el presente por referencia.

A través del uso de dicha tecnología, se ha producido anticuerpos monoclonales completamente humanos para diversos antígenos. Esencialmente, se inmunizan líneas de ratones XenoMouse® con un antígeno de interés (p. ej. PCSK9), se recuperan células linfáticas (por ejemplo células B) de los ratones hiperinmunizados y los linfocitos recuperados se fusionan con una línea celular de tipo mieloide para preparar líneas de células de hibridoma inmortales. Se evalúan y seleccionan estas líneas de células de hibridoma para identificar las líneas de

células de hibridoma que produjeron anticuerpos específicos para el antígeno de interés. En el presente se proporcionan métodos para la producción de múltiples líneas de células de hibridoma que producen anticuerpos específicos para PCSK9. Adicionalmente, en el presente se proporciona la caracterización de los anticuerpos producidos por dichas líneas celulares, incluso los análisis de secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de dichos anticuerpos.

La producción de las cepas de ratones XenoMouse® se analiza y expone adicionalmente en las solicitudes de patentes estadounidenses N.º de serie 07/466.008, presentada el 12 de enero de 1990, 07/610.515, presentada el 8 de noviembre de 1990, 07/919.297, presentada el 24 de julio de 1992, 07/922.649, presentada el 30 de julio de 1992, 08/031.801, presentada el 15 de marzo de 1993, 08/112.848, presentada el 27 de agosto de 1993, 08/234.145, presentada del 28 de abril de 1994, 08/376.279, presentada el 20 de enero de 1995, 08/430.938, presentada el 27 de abril de 1995, 08/464.584, presentada el 5 de junio de 1995, 08/464.582, presentada el 5 de junio de 1995, 08/463.191, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.837, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.853, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.857, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.859, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.513, presentada el 5 de junio de 1995, 08/724.752, presentada el 2 de octubre de 1996, 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996, la solicitud estadounidense 2003/0093820, presentada el 30 de noviembre de 2001 y las patentes estadounidenses N.º 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181 y 5.939.598 y las patentes japonesas N.º 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2. Véase también la patente europea N.º EP 0 463 151 B1, autorización publicada el 12 de junio de 1996, la solicitud de patente internacional N.º WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, solicitud de patente internacional N.º WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996, WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998, WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000. Las divulgaciones de cada una de las patentes citadas anteriormente, las solicitudes y las referencias se incorporan en el presente por referencia en su totalidad.

En un enfoque alternativo, otros, incluso GenPharm International, Inc., se han utilizado como enfoques de "minilocus". En el enfoque de minilocus, se imita un locus Ig exógeno a través de la inclusión de piezas (genes individuales) del locus Ig. Por lo tanto, se forman uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu y, usualmente, una segunda región constante (preferentemente una región constante gamma) en una construcción para la inserción en un animal. Este enfoque se describe en la patente estadounidense N.º 5.545.807 de Surani y col. y las patentes estadounidenses N.º 5.545.806,

5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.877.397, 5.874.299 y 6.255.458 de Lonberg & Kay, las patentes estadounidenses N.º 5.591.669 y 6.023.010 de Krimpenfort & Berns, las patentes estadounidenses N.º 5.612.205, 5.721.367 y 5.789.215 de Berns y col., la patente estadounidense N.º 5.643.763 de Choi & Dunn, las
5 solicitudes de patentes estadounidense de GenPharm International N.º de serie 07/574.748, presentada el 29 de agosto de 1990, 07/575.962, presentada el 31 de agosto de 1990, 07/810.279, presentada el 17 de diciembre de 1991, 07/853.408, presentada el 18 de marzo de 1992, 07/904.068, presentada el 23 de junio de 1992, 07/990.860, presentada el 16 de diciembre de 1992, 08/053.131, presentada el 26 de abril de 1993, 08/096.762, presentada el
10 22 de julio de 1993, 08/155.301, presentada el 18 de noviembre de 1993, 08/161.739, presentada el 3 de diciembre 1993, 08/165.699, presentada el 10 de diciembre de 1993, 08/209.741, presentada el 9 de marzo de 1994, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente por referencia. Véase también la patente europea N.º 0 546 073 B1, las solicitudes de patente internacional N.º WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO
15 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 y WO 98/24884 y la patente estadounidense N.º 5.981.175, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente por referencia en su totalidad. Véase también Taylor y col., 1992, Chen y col., 1993, Tuailon y col., 1993, Choi y col., 1993, Lonberg y col., (1994), Taylor y col., (1994) y Tuailon y col., (1995), Fishwild y col., (1996), cuyas divulgaciones se incorporan en el presente por referencia en su
20 totalidad.

Kirin también ha demostrado la generación de anticuerpos humanos de ratones en los cuales, a través de fusión de microcélulas, se han introducido grandes piezas de cromosomas o cromosomas enteros. Véase las solicitudes de patentes europeas N.º 773 288 y 843 961, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente por referencia. Adicionalmente, se ha generado
25 ratones KMTM, que son el resultado del cruzamiento de ratones Tc Kirin con ratones minilocus Medarex (Humab). Estos ratones poseen el transcromosoma IgH humano de ratones Kirin y el transgen de la cadena kappa de los ratones Genpharm (Ishida y col., Cloning Stem Cells, (2002) 4: 91-102).

Los anticuerpos humanos también se pueden derivar a través de métodos *in vitro*.
30 Ejemplos adecuados incluyen, entre otros, expresión de fagos (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (anteriormente Proliferon), Affimed) expresión de ribosomas (CAT), expresión de levadura y similares.

En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente poseen cadenas pesadas de IgG4 humana así como cadenas pesadas de IgG2. Los anticuerpos también

pueden ser de otros isotipos humanos, incluso IgG1. Los anticuerpos poseían afinidades altas, típicamente con una K_d de entre aproximadamente 10^{-6} y aproximadamente 10^{-13} M o menos, cuando se midieron a través de diversas técnicas.

Como se apreciará, los anticuerpos se pueden expresar en líneas celulares diferentes
5 las líneas de células de hibridoma. Se pueden utilizar secuencias que codifican anticuerpos particulares para transformar una célula huésped de mamífero adecuada. La transformación puede ser a través de cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluso, por ejemplo empaquetar el polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula huésped con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección
10 conocidos en la técnica, como se ejemplifica en las patentes estadounidenses N.º 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455 (cuyas patentes se incorporan en el presente por referencia). El procedimiento de transformación que se utilice dependerá del huésped que se vaya a transformar. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células
15 mamíferas son conocidos en la técnica y comprenden la transfección mediada por dextrano, la precipitación con fosfato de calcio, la transfección mediada por polibreno, la fusión de protoplastos, la electroporación, el encapsulamiento del(de los) polinucleótido(s) en liposomas y la microinyección directa del ADN en los núcleos.

Las líneas celulares mamíferas disponibles como huéspedes para la expresión se conocen en la técnica y comprenden muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la
20 Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), incluso, entre otros, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), células 293 del riñón epiteliales humanas y diversas líneas celulares diferentes. Se seleccionan líneas celulares de preferencia particular a través de la determinación de qué líneas celulares tienen niveles de
25 expresión altos y producen anticuerpos con propiedades constitutivas de unión a PCSK9.

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

En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos comprenden una molécula de inmunoglobulina de al menos un isotipo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, Ig E, IgA, IgD e IgM. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos comprenden una

cadena pasada kappa humana y/o una cadena pesada humana. En determinadas realizaciones, la cadena pesada es del isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD o IgM. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos se han clonado para la expresión en células mamíferas. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos comprenden una región constante diferente de cualquiera de las regiones constantes del isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD e IgM.

En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos comprenden una cadena ligera lambda humana y una cadena pesada IgG2 humana. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos comprenden una cadena ligera lambda humana y una cadena pesada IgG4 humana. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos comprenden una cadena ligera lambda humana y una cadena pesada IgG1, IgG3, IgE, IgA, IgD o IgM humana. En otras realizaciones, las proteínas de unión a antígenos comprenden una cadena ligera kappa humana y una cadena pesada IgG2 humana. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos comprenden una cadena ligera kappa humana y una cadena pesada IgG4 humana. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos comprenden una cadena ligera kappa humana y una cadena pesada IgG1, IgG3, IgE, IgA, IgD o IgM humana. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos comprenden regiones variables de anticuerpos ligados a una región constante que no es ni la región constante para el isotipo IgG2 ni la región constante para el isotipo IgG4. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos se han clonado para la expresión en células mamíferas.

En determinadas realizaciones, las modificaciones conservadoras a las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de al menos una de las líneas de hibridoma: 21B12, 31H4 y 16F12 (y las modificaciones correspondientes a los nucleótidos codificantes) producirán anticuerpos para PCSK9 que tienen características funcionales y químicas similares a las de los anticuerpos de las líneas de hibridoma: 21B12, 31H4 y 16F12. En contraste, en determinadas realizaciones, las modificaciones sustanciales en las características funcionales y químicas de los anticuerpos para PCSK9 se pueden lograr seleccionando sustituciones en la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la estructura principal molecular en el área de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) la mayor parte de la cadena lateral.

Por ejemplo, una "sustitución de aminoácidos conservadora" puede comprender una sustitución de un residuo de aminoácido nativo por un residuo no nativo de modo que hay poco

o nada de efecto en la polaridad o carga del residuo de aminoácido en esa posición. Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido también se puede sustituir por alanina, según se ha descrito previamente para "mutagénesis de exploración de alanina".

5 Los entendidos en la técnica pueden determinar sustituciones de aminoácidos (ya sean conservadoras o no conservadoras) en el momento se desean tales sustituciones. En determinadas realizaciones, se pueden utilizar sustituciones de aminoácidos para identificar residuos de anticuerpos importantes para PCSK9 o para aumentar o disminuir la afinidad de los anticuerpos con PCSK9 como se describe en el presente.

10 En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se pueden expresar en líneas celulares diferentes las líneas de células de hibridoma. En determinadas realizaciones, se pueden utilizar secuencias que codifican los anticuerpos particulares para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada. De acuerdo con determinadas realizaciones, la transformación puede ser a través de cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluso, por ejemplo empaquetar el
15 polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula huésped con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ejemplifica en las patentes estadounidenses N.º 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455 (cuyas patentes se incorporan en el presente por referencia para cualquier fin). En determinadas realizaciones, el procedimiento de transformación utilizado puede depender del huésped que se transformará. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células
20 mamíferas son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, la transfección mediada por dextrano, la precipitación con fosfato de calcio, la transfección mediada por polibreno, la fusión de protoplastos, la electroporación, el encapsulamiento del(de los) polinucleótido(s) en liposomas y la microinyección directa del ADN en los núcleos.

25 Las líneas celulares mamíferas disponibles como huéspedes para la expresión se conocen en la técnica e incluyen, entre otros, muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), incluso, entre otros, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2) y
30 diversas líneas celulares diferentes. En determinadas realizaciones, se pueden seleccionar líneas celulares a través de la determinación de qué líneas celulares tienen niveles de expresión altos y producen anticuerpos con propiedades constitutivas de unión a HGF. Se conocen vectores de expresión adecuados para las células huésped de mamífero.

En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos comprenden uno o

más polipéptidos. En determinadas realizaciones, se puede utilizar cualquiera de diversos vectores de expresión/sistemas huésped para expresar moléculas de polinucleótidos que codifican polipéptidos que comprenden uno o más componentes de ABP o la ABP en sí. Dichos sistemas incluyen, entre otros, microorganismos, por ejemplo bacterias transformadas con
5 vectores de expresión de ADN de plásmido, cósmido o bacteriófago recombinante; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas celulares de insecto infectados con vectores de expresión de virus (p. ej., baculovirus); sistemas celulares de planta transfectados con vectores de expresión de virus (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV, virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de bacterias (p.
10 ej., plásmido Ti o pBR322); o sistemas celulares animales.

En determinadas realizaciones, un polipéptido que comprende uno o más componentes de ABP u la ABP en sí se expresa de forma recombinante en levadura. Determinadas de dichas realizaciones utilizan sistemas de expresión disponibles, p. ej., el sistema de expresión *Pichia* (Invitrogen, San Diego, CA), que siguen las instrucciones del
15 fabricante. En determinadas realizaciones, este sistema se basa en la secuencia pre-pro-alfa para la secreción directa. En determinadas realizaciones, la transcripción del inserto está impulsada por el promotor de alcohol oxidasa (AOX1) luego de la inducción por metanol.

En determinadas realizaciones, se purifica un polipéptido secretado que comprende uno o más componentes de ABP o la ABP en sí del medio de crecimiento de levadura. En
20 determinadas realizaciones, los métodos utilizados para purificar un polipéptido del medio de crecimiento de levadura son los mismos que los utilizados para purificar el polipéptido de sobrenadantes de células mamíferas y bacterias.

En determinadas realizaciones, se clona un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende uno o más componentes de ABP o la ABP en sí en un vector de expresión
25 baculovirus, por ejemplo pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). En determinadas realizaciones, se puede utilizar este vector de acuerdo con las direcciones del fabricante (PharMingen) para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en medio libre de proteína sF9 y para producir polipéptido recombinante. En determinadas realizaciones, se purifica y se concentra un polipéptido de dicho medio utilizando una columna heparina-Sefarosa
30 (Pharmacia).

En determinadas realizaciones, un polipéptido que comprende uno o más componentes de ABP u la ABP en sí se expresa en un sistema de insecto. Los entendidos en la técnica conocen determinados sistemas de insectos para la expresión de polipéptidos. En uno de estos sistemas, se utiliza el *virus de la polihedrosis nuclear de Autographacalifornica*

(AcNPV) como un vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. En determinadas realizaciones, se puede insertar una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido en un gen no esencial del virus, por ejemplo, dentro del gen de polihedrina y colocar bajo el control del promotor para ese gen. En determinadas realizaciones, la inserción exitosa de una molécula de ácido nucleico hará inactivo del gen no esencial. En determinadas realizaciones, la inactivación da lugar a una característica detectable. Por ejemplo, la inactivación del gen de polihedrina da lugar a la producción de virus que carece de cubierta proteínica.

En determinadas realizaciones, se pueden utilizar virus recombinantes para infectar células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia*. Véase, p. ej., Smith y col., J. Virol., 46: 584 (1983); Engelhard y col., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 91: 3224-7 (1994).

En determinadas realizaciones, polipéptidos que comprenden uno o más componentes de ABP o la ABP en sí hechos en células bacterianas se producen como cuerpos de inclusión insolubles en las bacterias. En determinadas realizaciones, se recolectan células huésped que comprenden dichos cuerpos de inclusión mediante centrifugación; se lavan en 0,15 M de NaCl, 10 mM de Tris, pH 8, 1 mM de EDTA; y se tratan con 0,1 mg/ml de lisozima (Sigma, St. Louis, MO) durante 15 minutos a temperatura ambiente. En determinadas realizaciones, se elimina el lisato por sonicación y se sedimentan los residuos celulares mediante centrifugación durante 10 minutos en 12.000 X g. En determinadas realizaciones, el sedimento que contiene polipéptido se suspende nuevamente en 50 mM de Tris, pH 8 y 10 mM de EDTA; se coloca en capas durante sobre el 50 % de glicerol; y se centrifuga durante 30 minutos en 6000 X g. En determinadas realizaciones, ese sedimento se puede suspender nuevamente en solución estándar de salina con tampón de fosfato (PBS) libre de Mg^{++} y Ca^{++} . En determinadas realizaciones, el polipéptido se purifica adicionalmente mediante fraccionamiento del sedimento suspendido nuevamente en un gel de poliacrilamida de SDS desnaturalizado (véase, p. ej., Sambrook y col., mencionado anteriormente). En determinadas realizaciones, este gel se puede remojar en 0,4 M de KCl para visualizar la proteína, que se puede escindir y electroeluir en tampón de ejecución de gel que carece de SDS. De acuerdo con determinadas realizaciones, se produce una proteína de fusión Glutación-S-transferasa (GST) en bacterias como una proteína soluble. En determinadas realizaciones, se purifica dicha proteína de fusión GST utilizando un módulo de purificación de GST (Pharmacia).

En determinadas realizaciones, es deseable "replegar" determinados polipéptidos, p. ej., los polipéptidos que comprenden uno o más componentes de ABP o la ABP en sí. En determinadas realizaciones, se producen dichos polipéptidos utilizando determinados sistemas

recombinantes planteados en el presente. En determinadas realizaciones, los polipéptidos se "replegar" y/o oxidan para formar una estructura terciaria deseada y/o para generar enlaces disulfuro. En determinadas realizaciones, dicha estructura y/o enlaces están relacionados con determinada actividad biológica de un polipéptido. En determinadas realizaciones, se logra
5 replegar utilizando cualquiera de diversos procedimientos conocidos en la técnica. Métodos ejemplares incluyen, entre otros, la exposición del agente de polipéptido solubilizado a un pH típicamente superior a 7 en presencia de un agente caotrópico. Un agente caotrópico ejemplar es guanidina. En determinadas realizaciones, la solución de replegamiento/oxidación también contiene un agente reductor y la forma oxidada de ese agente reductor. En determinadas
10 realizaciones, el agente reductor y su forma oxidada están presentes en una relación que generará un potencial redox particular que permite al disulfuro reordenarse para que se produzca. En determinadas realizaciones, dicho reordenamiento permite la formación de puentes de cisteína. Pares redox ejemplares incluyen, entre otros, cisteína/cistamina, glutatión/ditiobisGSH, cloruro cúprico, ditiotreitól DTT/ditiano DTT y 2-mercaptoetanol
15 (bME)/ditio-bME. En determinadas realizaciones, se utiliza un codisolvente para aumentar la eficacia del replegamiento. Codisolventes ejemplares incluyen, entre otros, glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares y arginina.

En determinadas realizaciones, se purifica sustancialmente un polipéptido que comprende uno o más componentes de ABP o la ABP en sí. Los entendidos en la técnica
20 conocen determinadas técnicas de purificación de proteínas. En determinadas realizaciones, la purificación de proteínas comprende el fraccionamiento crudo de fraccionamientos de polipéptidos de fracciones no polipeptídicas. En determinadas realizaciones, se purifica polipéptidos utilizando técnicas cromatográficas y/o electroforéticos. Los métodos de purificación ejemplares incluyen, entre otros, la precipitación con sulfato de amonio;
25 precipitación con PEG; inmunoprecipitación; desnaturalización por calor seguido de centrifugación; cromatografía, incluso, entre otros, cromatografía de afinidad (p. ej., proteína A-sefarosa), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión y cromatografía de fase inversa; filtración en gel; cromatografía de hidroxapatita; centrado isoelectrico; electroforesis de gel de poliacrilamida; y combinaciones de dichas y otras técnicas. En
30 determinadas realizaciones, se purifica un polipéptido mediante cromatografía líquida de proteína rápida o mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En determinadas realizaciones, las etapas de purificación se pueden cambiar o determinadas etapas se pueden omitir y aún así dar lugar a un método adecuado para la preparación de un polipéptido sustancialmente purificado.

En determinadas realizaciones, se cuantifica el grado de purificación de una preparación de polipéptido. Los entendidos en la técnica conocen determinados métodos para cuantificar el grado de purificación. Algunos métodos ejemplares incluyen, entre otros, determinar la actividad de unión específica de la preparación y evaluar la cantidad de un polipéptido dentro de una preparación por análisis SDS/PAGE. Algunos métodos ejemplares para evaluar la cantidad de purificación de una preparación de polipéptido comprenden calcular la actividad de unión de una preparación y compararla con la actividad de unión de un extracto inicial. En determinadas realizaciones, los resultados de dicho cálculo se expresan como "purificación doble". Las unidades utilizadas para representar la cantidad de actividad de unión depende del ensayo particular realizado.

En determinadas realizaciones, se purifica parcialmente un polipéptido que comprende uno o más componentes de ABP o la ABP en sí. En determinadas realizaciones, la purificación parcial se puede lograr utilizando menos etapas de purificación o utilizando formas diferentes del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato HPLC generalmente producirán una mayor "purificación doble" que la misma técnica que utiliza un sistema de cromatografía de baja presión. En determinadas realizaciones, los métodos que producen un menor grado de purificación pueden tener ventajas en la recuperación total del polipéptido o en el mantenimiento de la actividad de unión de un polipéptido.

En determinados casos, la migración electroforética de un polipéptido puede variar, a veces significativamente, con diferentes condiciones de SDS/PAGE. Véase, p. ej., Capaldi y col., Biochem. Biophys. Res. Comm., 76: 425 (1977). Se apreciará que en diferentes condiciones de electroforesis, los pesos moleculares aparentes de un polipéptido purificado o parcialmente purificado pueden ser diferentes.

25 Epítopos ejemplares

Se proporcionan epítopos a los cuales se unen los anticuerpos anti-PCSK9. En determinadas realizaciones, los epítopos que se unen por los anticuerpos aquí divulgados son particularmente útiles. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos que se unen a cualquiera de los epítopos que se unen por los anticuerpos descritos aquí son útiles. En algunas realizaciones, los epítopos unidos por cualquiera de los anticuerpos enumerados en la tabla 2 y las figuras 2 y 3 son especialmente útiles. En algunas realizaciones, el epítipo se encuentra en el dominio catalítico PCSK9.

En algunas realizaciones, se puede utilizar un epítipo de PCSK9 para evitar (p. ej., reducir) la unión con un anticuerpo anti-PCSK9 o proteína de unión a antígenos con PCSK9. En

determinadas realizaciones, se puede utilizar un epítipo de PCSK9 para disminuir la unión de un anticuerpo anti-PCSK9 o proteína de unión a antígenos con PCSK9. En determinadas realizaciones, se puede utilizar un epítipo de PCSK9 para inhibir sustancialmente la unión de un anticuerpo anti-PCSK9 o proteína de unión a antígenos con PCSK9.

5 En determinadas realizaciones, se puede utilizar un epítipo de PCSK9 para aislar los anticuerpos o proteínas de unión a antígenos que se unen a PCSK9. En determinadas realizaciones, se puede utilizar un epítipo de PCSK9 para generar los anticuerpos o proteínas de unión a antígenos que se unen a PCSK9. En determinadas realizaciones, se puede utilizar un epítipo de PCSK9 o una secuencia que comprende un epítipo de PCSK9 como un
10 inmunógeno para generar los anticuerpos o proteínas de unión a antígenos que se unen a PCSK9. En determinadas realizaciones, se puede administrar un epítipo de PCSK9 a un animal y, posteriormente, se pueden obtener del animal los anticuerpos que se unen a PCSK9. En determinadas realizaciones, se puede utilizar un epítipo de PCSK9 o una secuencia que comprende un epítipo de PCSK9 para interferir con la actividad mediada por PCSK9 normal,
15 por ejemplo la asociación de PCSK9 con el LDLR.

 En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos divulgadas en el presente se unen específicamente al prodominio del terminal N, un dominio catalítico parecido a subtilisina y/o un dominio del terminal C. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos se une a la ranura de unión al sustrato de PCSK-9 (descrita en Cunningham y col.,
20 incorporado en el presente en su totalidad por referencia).

 En algunas realizaciones, se pueden identificar dominios/regiones que contienen residuos que están en contacto o están enterrados en un anticuerpo mediante la mutación de residuos específicos en PCSK9 (p. ej., un antígeno natural) y la determinación de si la proteína de unión a antígenos se puede unir a la proteína PCSK9 mutada o variante. Al realizar diversas
25 mutaciones individuales, se pueden identificar los residuos que cumplen una función directa en la unión o que están en una proximidad suficientemente cerca al anticuerpo de modo que una mutación puede afectar la unión entre la proteína de unión a antígenos y el antígeno. A partir del conocimiento de estos aminoácidos, se pueden elucidar los dominios o regiones del antígeno que contienen residuos en contacto con la proteína de unión a antígenos o cubiertos
30 por el anticuerpo. Tal dominio puede incluir el epítipo de unión de una proteína de unión a antígenos. Un ejemplo específico de este enfoque general utiliza un protocolo de exploración de ácidos de arginina/glutámicos (véase, p. ej., Nanevycz, T. y col., 1995, *J. Biol. Chem.*, 270: 37, 21619-21625 y Zupnick, A. y col., 2006, *J. Biol. Chem.*, 281: 29, 20464-20473). En general, los ácidos de arginina y glutámicos se sustituyen (típicamente individualmente) por un aminoácido

en el polipéptido natural debido a que estos aminoácidos están cargados y son pesados y, por lo tanto, tienen el potencial para alterar la unión entre una proteína de unión a antígenos y un antígeno en la región del antígeno en donde se introduce la mutación. Las argininas que existen en el antígeno natural se reemplazan por ácido glutámico. Se obtienen varios de dichos mutantes individuales y los resultados de unión recolectados analizados para determinar que residuos afectan la unión.

Una alteración (por ejemplo una reducción o aumento) en la unión entre una proteína de unión a antígenos y una PCSK9 variante, según se emplea aquí, significa que existe un cambio en la afinidad de unión (p. ej., según lo medido a través de métodos conocidos tales como evaluación Biacore o el ensayo basado en perlas descrito a continuación en los ejemplos), EC_{50} , y/o una cambio (por ejemplo una reducción) en la capacidad de unión total de la proteína de unión a antígenos (por ejemplo, como lo demuestra una disminución en B_{max} en una muestra de concentración de proteína de unión a antígenos respecto a la concentración del antígeno). Una alteración significativa de la unión indica que el residuo mutado está directamente involucrado en la unión a la proteína de unión a antígenos o que está en estrecha proximidad con la proteína de unión cuando la proteína de unión está unida al antígeno.

En algunas realizaciones, una reducción significativa en la unión significa que la afinidad de unión, EC_{50} y/o capacidad entre una proteína de unión a antígenos y un antígeno de PCSK9 mutante se reduce en más del 10 %, en más del 20 %, en más del 40 %, en más del 50 %, en más del 55 %, en más del 60 %, en más del 65 %, en más del 70 %, en más del 75 %, en más del 80 %, en más del 85 %, en más del 90 % o en más del 95 % en comparación con una unión entre la proteína de unión a antígenos y una PCSK9 natural (p. ej., que se muestra en SEC. ID. N.º: 1 y/o SEC. ID. N.º: (303). En determinadas realizaciones, la unión se reduce debajo de los límites detectables. En algunas realizaciones, se demuestra una reducción significativa en la unión cuando la unión de una proteína de unión a antígenos con una proteína PCSK9 variante es menor que el 50 % (por ejemplo, menor que el 40 %, el 35 %, el 30 %, el 25 %, el 20 %, el 15 % o el 10 %) de la unión observada entre la proteína de unión a antígenos y una proteína PCSK9 natural (por ejemplo, la proteína de SEC. ID. N.º: 1 y/o SEC. ID. N.º: (303). Dichas mediciones de unión se pueden realizar utilizando diversos ensayos de unión conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, se proporcionan proteínas de unión a antígenos que presentan unión significativamente inferior de una proteína PCSK9 variante en la cual se sustituye un residuo en una proteína PCSK9 natural (p. ej., SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303 por ácido de arginina o glutámico. En algunas realizaciones, la unión de una proteína de unión a

antígenos se reduce o aumenta significativamente por una proteína PCSK9 variante que tiene una cualquiera o más (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 244) de las siguientes mutaciones: R207E, D208R, R185E, R439E, E513R, V538R, E539R, T132R, S351R, A390R, A413R, E582R, D162R, R164E, E167R, S123R, E129R, A311R, D313R, D337R, R519E, H521R y Q554R en comparación con una proteína PCSK9 natural (p. e., SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303. En la notación taquigráfica utilizada aquí, el formato es: Residuo natural: Posición en el polipéptido: Residuo mutante, con la numeración de los residuos como indica en SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303.

En algunas realizaciones, la unión de una proteína de unión a antígenos se reduce o aumenta significativamente por una proteína PCSK9 mutante que tienen una o más (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o más) mutaciones en las siguientes posiciones: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 y 554, como se muestra en SEC. ID. N.º: 1 en comparación con una proteína PCSK9 natural (p. ej., SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303. En algunas realizaciones, la unión de una proteína de unión a antígenos se reduce o aumenta por una proteína PCSK9 mutante que tienen una o más (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o más) mutaciones en las siguientes posiciones: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 y 554, como se muestra en SEC. ID. N.º: 1 en comparación con una proteína PCSK9 natural (p. ej., SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303. En algunas realizaciones, la unión de una proteína de unión a antígenos se reduce o aumenta sustancialmente por una proteína PCSK9 mutante que tienen una o más (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o más) mutaciones en las siguientes posiciones: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 y 554, dentro de SEC. ID. N.º: 1 en comparación con una proteína PCSK9 natural (p. ej., SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303.

En algunas realizaciones, la unión de una ABP se reduce o aumenta significativamente por una proteína PCSK9 mutante que tiene una o más (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, etc.) de las siguientes mutaciones: R207E, D208R, R185E, R439E, E513R, V538R, E539R, T132R, S351R, A390R, A413R, E582R, D162R, R164E, E167R, S123R, E129R, A311R, D313R, D337R, R519E, H521R y Q554R dentro de SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303, en comparación con una proteína PCSK9 natural (p. ej., SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303).

En algunas realizaciones, la unión de una ABP se reduce o aumenta significativamente por una proteína PCSK9 mutante que tiene una o más (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, etc.) de las siguientes mutaciones: R207E, D208R, R185E, R439E, E513R, V538R, E539R, T132R, S351R, A390R, A413R y E582R dentro de SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303, en comparación con una

proteína PCSK9 natural (p. ej., SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303). En algunas realizaciones, la unión se reduce. En algunas realizaciones, la reducción en la unión se observa como un cambio en EC50. En algunas realizaciones, el cambio en EC50 es un aumento en el valor numérico de la EC50 (y, por lo tanto, es una disminución en la unión).

5 En algunas realizaciones, la unión de una ABP se reduce o aumenta significativamente por una proteína PCSK9 mutante que tiene una o más (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, etc.) de las siguientes mutaciones: D162R, R164E, E167R, S123R, E129R, A311R, D313R, D337R, R519E, H521R y Q554R dentro de SEC. ID. N.º: 1, en comparación con una proteína PCSK9 natural (p. ej., SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303). En algunas realizaciones, la unión se reduce. En algunas
10 realizaciones, la reducción en la unión se observa como un cambio en Bmax. En algunas realizaciones, el cambio en Bmax es una reducción de la señal máxima generada por la ABP. En algunas realizaciones, para que un aminoácido forme parte de un epítipo, la Bmax se reduce en al menos el 10 %, por ejemplo, reducciones de al menos cualquiera de las siguientes cantidades: el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80, el 90, el 95, el 98, el 99 o el 100 por
15 ciento puede, en algunas realizaciones, indicar que el residuo forma parte del epítipo.

Aunque se hace referencia a las formas variantes que se acaban de enumerar con respecto a la secuencia natural que se muestra en SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303, se apreciará que en un variante alélica de PCSK9 el aminoácido en la posición indicada puede diferir. También se contemplan las proteínas de unión a antígenos que se muestran disminuyen
20 significativamente la unión para dichas formas alélicas de PCSK9. Por lo tanto, en algunas realizaciones, cualquiera de las realizaciones anteriores se pueden comparar con una secuencia alélica, en lugar de exclusivamente la secuencia natural que se muestra en la figura 1A.

En algunas realizaciones, la unión de una proteína de unión a antígenos se reduce por
25 una proteína PCSK9 variante en la cual el residuo en la posición seleccionada en la proteína PCSK9 natural se reemplaza a cualquier otros residuo. En algunas realizaciones, se utilizan los reemplazos de ácidos de arginina/glutámicos descritos en el presente para las posiciones identificadas. En algunas realizaciones, se utiliza alanina para las posiciones identificadas.

Como se indicó anteriormente, se pueden identificar los residuos involucrados
30 directamente en la unión o cubiertos por una proteína de unión a antígenos a partir de los resultados de la exploración. Por lo tanto, estos residuos pueden proporcionar una indicación de los dominios o regiones de SEC. ID. N.º: 1 (o SEC. ID. N.º: 303 o SEC. ID. N.º: 3) que contienen las regiones de unión a las cuales se unen las proteínas de unión a antígenos. Como se puede observar a partir de los resultados que se resumen en el ejemplo 39, en algunas realizaciones,

una proteína de unión a antígenos se une a un dominio que contiene al menos uno de los aminoácidos: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 y 554 de SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos se une a una región que contiene al menos uno de los aminoácidos 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 y 554 de SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos se une a una región que contiene al menos uno de los aminoácidos 162, 164, 167, 207 y/o 208 de SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303. En algunas realizaciones, más de uno (p. ej., 2, 3, 4 o 5) de los residuos identificados forman parte de la región que está unida por la ABP. En algunas realizaciones, la ABP compete con ABP 21B12.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos se une a una región que contiene al menos uno de los aminoácidos 185 de SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303. En algunas realizaciones, la ABP compete con ABP 31H4.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos se une a una región que contiene al menos uno de los aminoácidos 439, 513, 538 y/o 539 de SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303. En algunas realizaciones, más de uno (p. ej., 2, 3 o 4) de los residuos identificados forman parte de la región que está unida por la ABP. En algunas realizaciones, la ABP compete con ABP 31A4.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos se une a una región que contiene al menos uno de los aminoácidos 123, 129, 311, 313, 337, 132, 351, 390 y/o 413 de SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303. En algunas realizaciones, más de uno (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9) de los residuos identificados forman parte de la región que está unida por la ABP. En algunas realizaciones, la ABP compete con ABP 12H11.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígenos se une a una región que contiene al menos uno de los aminoácidos 582, 519, 521 y/o 554 de SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303. En algunas realizaciones, más de uno (p. ej., 2, 3 o 4) de los residuos identificados forman parte de la región que está unida por la ABP. En algunas realizaciones, la ABP compete con ABP 3C4.

En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígenos se unen a las regiones anteriores dentro de un fragmento o la secuencia completa de SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303. En otras realizaciones, las proteínas de unión a antígenos se unen a los polipéptidos que consisten en estas regiones. La referencia a "SEC. ID. N.º: 1 o SEC. ID. N.º: 303" denota que una o ambas secuencias se pueden emplear o son relevantes. La frase no denota que

solamente se deba emplear una.

Como se indicó anteriormente, la descripción anterior hace referencia específicamente a las posiciones de aminoácidos con referencia a SEC. ID. N.º: 1. Sin embargo, a lo largo de la memoria descriptiva generalmente, se hace referencia a un dominio Pro/Cat que comienza en la posición 31, que se proporciona en SEC. ID. N.º: 3. Como se menciona más adelante, SEC. ID. N.º: 1 y SEC. ID. N.º: 303 carecen de la secuencia señal de PCSK9. Por lo tanto, cualquier comparación entre estas diversas divulgaciones debe tener en cuenta esta diferencia en la numeración. En particular, cualquier posición de aminoácido en SEC. ID. N.º: 1, corresponderá a los aminoácidos de una posición de aminoácido 30 en la proteína en SEC. ID. N.º: 3. Por ejemplo, la posición 207 de SEC. ID. N.º: 1, corresponde a la posición 237 de SEC. ID. N.º: 3 (la secuencia completa y el sistema de numeración utilizado en la presente especificación generalmente). La tabla 39.6 describe cómo las posiciones mencionadas anteriormente, cuya referencia SEC. ID. N.º: 1 (y/o SEC. ID. N.º: 303) corresponde a SEC. ID. N.º: 3 (que incluye la secuencia señal). Por lo tanto, cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente que se describen con respecto a SEC. ID. N.º: 1 (y/o SEC. ID. N.º: 303), se describe con referencia a SEC. ID. N.º: 3, por las posiciones mencionadas correspondientes.

En algunas realizaciones, ABP 21B12 se une a un epítipo que incluye los residuos 162-167 (p. ej., los residuos D162-E167 de SEC. ID. N.º: 1). En algunas realizaciones, ABP 12H11 se une a un epítipo que incluye los residuos 123-132 (p. ej., S123-T132 de SEC. ID. N.º: 1). En algunas realizaciones, ABP 12H11 se une a un epítipo que incluye los residuos 311-313 (p. ej., A311-D313 de SEC. ID. N.º: 1). En algunas realizaciones, las ABP se pueden unir a un epítipo que incluye cualquiera de estas cadenas de secuencias.

Proteínas de unión a antígenos de competencia

En otro aspecto, se proporcionan proteínas de unión a antígenos que compiten con uno de los anticuerpos ejemplificados o fragmentos funcionales que se unen al epítipo descrito en el presente para la unión específica a PCSK9. Dichas proteínas de unión a antígenos también se pueden unir al mismo epítipo que una de las proteínas de unión a antígenos ejemplificadas aquí, o un epítipo que se superpone. Se espera que las proteínas de unión a antígenos y los fragmentos que compiten o se unen al mismo epítipo que las proteínas de unión a antígenos ejemplificadas muestren propiedades funcionales similares. Las proteínas de unión a antígenos ejemplificadas y los fragmentos incluyen los descritos anteriormente, incluso los que tienen las cadenas pesada y ligera, los dominios de región variable y las CDR incluidas en la TABLA 2 y/o las figuras 2-3. Por lo tanto, como un ejemplo específico, las proteínas de unión a antígenos que se proporcionan incluyen las que compiten con un anticuerpo o proteína

de unión a antígenos que tiene:

- (a) las 6 de las CDR enumeradas para un anticuerpo enumerado en las figuras 2-3;
- (b) un VH y un VL enumerado para un anticuerpo enumerado en la tabla 2; o
- (c) dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas como se especifica para un anticuerpo

5 enumerado en la tabla 2.

Administración y formulaciones farmacéuticas terapéuticas

La presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas que contienen proteínas de unión a antígenos para PCSK9. Según se emplea aquí, "formulación farmacéutica" es una composición estéril de un fármaco farmacéuticamente activo, es decir, al menos una

10 proteína de unión a antígeno para PCSK9, que es adecuada para la administración parenteral (incluso, entre otros, intramuscular, subcutánea, en aerosol, intrapulmonar, intranasal o intratecal) a un paciente que la necesita e incluye solamente los excipientes, diluyentes y otros

aditivos farmacéuticamente aceptables considerados seguros por la Administración federal de drogas u otras autoridades nacionales y extranjeras. Las formulaciones farmacéuticas incluyen

15 soluciones líquidas, p. ej., acuosas, que se pueden administrar directamente y polvos liofilizados que se pueden reconstituir en soluciones añadiendo un diluyente antes de la administración. Específicamente excluidos del alcance del término "formulación farmacéutica" hay composiciones para la administración tópica a pacientes, composiciones para la ingestión oral y composiciones para la alimentación parenteral.

20 En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación farmacéutica estable. Según se emplea aquí, las frases "formulación farmacéutica estable", "formulación estable" o "una formulación farmacéutica es estable" se refieren a una formulación farmacéutica de proteínas biológicamente activas que presenta mayor agregación y/o pérdida reducida de actividad biológica de no más que el 5 % cuando se almacena a 2-8 °C durante al

25 menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año o 2 años en comparación con una muestra de fórmula de control. El entendido en la técnica puede determinar fácilmente la estabilidad de la formulación utilizando cualquiera de los ensayos estándar, incluso, entre otros, HPLC de exclusión por tamaño ("SEC-HPLC"), HPLC de intercambio catiónico (CEX-HPLC), detección de partículas subvisibles por oscurecimiento de la luz ("HIAC") y/o inspección visual.

30 En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende cualquiera de las proteínas de unión a antígenos para PCSK9 ilustradas en la tabla 2 y las figuras 2 y/o 3 y las figuras 48A y 48B. En otras realizaciones, la formulación farmacéutica puede comprender otras proteínas de unión a antígenos para PCSK9; es decir, un anticuerpo comprendido de un dominio variable de cadena ligera, SEC. ID. N.º: 588 y un dominio variable de cadena pesada,

SEC. ID. N.º: 589. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende cualquiera de 21B12, 26H5, 31H4, 8A3, 11F1 o 8A1.

En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende más de una proteína de unión a antígenos para PCSK9 diferente. En determinadas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas comprenden más de una proteína de unión a antígenos para PCSK9 en donde las proteínas de unión a antígenos para PCSK9 se unen a más de un epítipo. En algunas realizaciones, las diversas proteínas de unión a antígenos no competirán entre sí para la unión a PCSK9. En algunas realizaciones, cualquiera de las proteínas de unión a antígenos ilustradas en la tabla 2 y las figuras 2 y/o 3 se puede combinar entre sí en una formulación farmacéutica.

En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígenos para PCSK9 y/o una molécula terapéutica está unida a un vehículo que se extiende por la vida media conocido en la técnica. Dichos vehículos incluyen, entre otros, polietilenglicol, glucógeno (p. ej., glicosilación de la ABP) y dextrano. Dichos vehículos se describen, p. Ej., en la solicitud estadounidense N.º de serie 09/428.082, ahora patente estadounidense N.º 6.660.843 y la solicitud de PCT publicada N.º WO 99/25044, que se incorporan en el presente por referencia para cualquier fin.

En determinadas realizaciones, referentemente, los materiales de formulación aceptables no son tóxicos para el destinatario en las dosis y en las concentraciones empleadas. En algunas realizaciones, los materiales de la formulación son para la administración subcutánea y/o intravenosa. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolalidad, la viscosidad, la transparencia, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la tasa de disolución o de liberación, la absorción o la penetración de la composición.

En dichas realizaciones, los materiales de formulación adecuados comprenden, entre otros, aminoácidos (por ejemplo, prolina, arginina, lisina, metionina, taurina, glicina, glutamina o asparagina); antimicrobianos; antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, sulfito de sodio o sulfito de hidrógeno de sodio); tampones (por ejemplo, borato, bicarbonato, fosfato de sodio ("NaOAC"), Tris-HCl, tampón Tris, citrato, tampón de fosfato, salina con tampón de fosfato (es decir, tampón PBS) u otros ácidos orgánicos); agentes espesantes (por ejemplo, manitol o glicina); agentes quelantes (por ejemplo, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA)); agentes aglutinantes (por ejemplo, cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); rellenos; monosacáridos; disacáridos y otros carbohidratos (por ejemplo, glucosa, sucrosa, fructosa, lactosa, manosa, trehalosa o dextrinas); proteínas (por ejemplo, albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, saborizantes y diluyentes; agentes

emulsionantes; polímeros hidrofílicos (por ejemplo, polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones de formación de sales (por ejemplo, sodio); conservantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, fenetil alcohol, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); solventes (por ejemplo, glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (por ejemplo, manitol o sorbitol); agentes de suspensión; agentes surfactantes o humectantes (por ejemplo, plurónicos, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbato, por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80, tritón, trimetamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes de aumento de la estabilidad (por ejemplo, sucrosa o sorbitol); agentes de aumento de la tonicidad (por ejemplo, haluros de metales alcalinos, por ejemplo, cloruro de sodio o de potasio, manitol sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995).

En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica óptima será determinada por el entendido en la técnica según, por ejemplo, la vía de administración prevista, el formato de administración y la dosis deseada. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, mencionado anteriormente. En determinadas realizaciones, dichas formulaciones pueden afectar el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y la tasa de depuración *in vivo* de los anticuerpos de la invención.

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

aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 210 mg/ml, aproximadamente 220 mg/ml o aproximadamente 250 mg/ml.

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

En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica es isotónica con una osmolalidad que oscila entre aproximadamente 250 y aproximadamente 350 miliosmol/kg, p. ej., aproximadamente 250 mOsm/kg, aproximadamente 260 mOsm/kg, aproximadamente 270 mOsm/kg, aproximadamente 280 mOsm/kg, aproximadamente 290 mOsm/kg, aproximadamente 300 mOsm/kg, aproximadamente 310 mOsm/kg, aproximadamente 320 mOsm/kg, aproximadamente 330 mOsm/kg, aproximadamente 340 mOsm/kg o aproximadamente 350 mOsm/kg, incluyendo todos los valores intermedios. Según se emplea aquí, "osmolalidad" es la medida de la relación de solutos con el volumen líquido. En otras palabras, es el número de moléculas e iones (o moléculas) por kilogramo de una solución. La osmolalidad se puede medir en un instrumento analítico denominado osmómetro, por ejemplo el osmómetro de muestreo múltiple 2020 de Advanced Instruments, Norwood, MA. El osmómetro de muestreo múltiple 2020 de Advanced Instruments mide la osmolalidad utilizando el método de depresión del punto de congelación. Cuanto más grandes son los osmolitos en una solución, más desciende la temperatura en la cual se congelará. La osmolalidad también se puede medir utilizando otros métodos y en cualquier otra unidad conocida en la técnica, por ejemplo extrapolación lineal.

En otro aspecto, la formulación farmacéutica comprende al menos un surfactante que incluye, entre otros, polisorbato-80, polisorbato-60, polisorbato-40 y polisorbato-20. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un surfactante en una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,004 % y aproximadamente el 10 % en peso por volumen ("p/v") de la formulación, p. ej., aproximadamente el 0,004 %, aproximadamente el 0,005 %, aproximadamente el 0,006 %, aproximadamente el 0,007 %, aproximadamente el 0,008 %, aproximadamente el 0,009 %, aproximadamente el 0,01 %, aproximadamente el 0,05 %, aproximadamente el 0,1 %, aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 5 % aproximadamente el 10 % de surfactante p/v de la formulación. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende polisorbato 80 en una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,004 % y aproximadamente el 0,1 % p/v de la formulación. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende polisorbato 20 en una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,004 % y aproximadamente el 0,1 % p/v de la formulación.

En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende al menos un agente estabilizante, por ejemplo un polihidroxi hidrocarburo (incluso, entre otros, sorbitol, manitol, glicerol y dulcitol) y/o un disacárido (incluso, entre otros, sucrosa, lactosa, maltosa y trehalosa) y/o un aminoácido (incluso, entre otros, prolina, arginina, lisina, metionina y taurina) y/o alcohol bencílico; el total de dicho polihidroxi hidrocarburo, disacárido, aminoácido, alcohol bencílico de entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 10 % p/v de la formulación. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante en una concentración de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 % o aproximadamente el 10 % de sucrosa. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante en una concentración de aproximadamente el 5 % de sucrosa. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante en una concentración de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 % o aproximadamente el 10 % de sorbitol. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante en una concentración de aproximadamente el 9% de sorbitol. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante en una concentración de

aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 % de prolina, arginina, lisina, metionina y/o taurina. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante en una concentración de entre aproximadamente el 2 % y el 3 % de prolina. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante en una concentración de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 % de alcohol bencílico. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante en una concentración de entre aproximadamente el 1 % y el 2 % de alcohol bencílico.

En un aspecto, la formulación farmacéutica tiene un nivel de viscosidad menor que aproximadamente 30 centipoise (cP) según lo medido a temperatura ambiente (es decir, 25°C). Según se emplea aquí, "viscosidad" es la resistencia de un fluido para fluir y se puede medir en unidades de centipoise (cP) o miliPascal-segundos (mPa-s), en donde 1 cP=1 mPa-s, en una determinada velocidad de corte. La viscosidad se puede medir utilizando un viscosímetro, p. ej., viscosímetro de lectura del dial de ingeniería de Brookfield, modelo LVT. La viscosidad también se puede medir utilizando otros métodos y en cualquier otra unidad conocida en la técnica (p. ej., viscosidad absoluta o viscosidad dinámica, cinética, absoluta). En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica tienen un nivel de viscosidad menor que aproximadamente 25 cP, aproximadamente 20 cP, aproximadamente 18 cP, aproximadamente 15 cP, aproximadamente 12 cP, aproximadamente 10 cP; aproximadamente 8 cP, aproximadamente 6 cP, aproximadamente 4 cP; aproximadamente 2 cP; o aproximadamente 1 cP.

En un aspecto, la formulación farmacéutica es estable según lo medido a través de al menos un ensayo de estabilidad conocido para el entendido en la técnica, por ejemplo ensayos que examina las características biofísicas o bioquímicas de las proteínas biológicamente activas en el tiempo. Como se indicó anteriormente, una formulación farmacéutica estable de la presente invención es una formulación farmacéutica de proteínas biológicamente activas que presenta mayor agregación y/o pérdida reducida de actividad biológica de no más que el 5 % cuando se almacena a 2-8 °C durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año o 2 años en comparación con una muestra de fórmula de control. En determinadas realizaciones, la estabilidad de la formulación farmacéutica se mide utilizando HPLC de exclusión por tamaño ("SEC-HPLC"). SEC-HPLC separa las proteínas según las diferencias en sus volúmenes hidrodinámicos. Las moléculas con más grandes volúmenes de proteínas hidrodinámicos se eluyen más temprano que las moléculas con volúmenes más pequeños. En el caso de SEC-

HPLC, una formulación farmacéutica estable presentará un aumento de no más que aproximadamente el 5 % especies con peso molecular alto en comparación con la muestra de control. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica presentará un aumento de más que aproximadamente un 4%, no más que aproximadamente un 3 %, no más que
5 aproximadamente un 2 %, no más que aproximadamente un 1 %, no más que aproximadamente un 0,5 % en especies con peso molecular alto en comparación con una muestra de control.

En determinadas realizaciones, la estabilidad de la formulación farmacéutica se mide utilizando HPLC de intercambio catiónico (CEX-HPLC). CEX-HPLC separa las proteínas según
10 las diferencias en su carga de la superficie. En un pH fijo, se separan isoformas cargadas de una ABP anti-PCSK9 un una columna de intercambio catiónico y se eluyen utilizando un gradiente salino. El eluyente se monitoriza por absorbancia UV. Se evalúa la distribución de las isoformas cargadas determinando el área del pico de cada isoforma como un porcentaje del área del pico total. En el caso de CEX-HPLC, una formulación farmacéutica estable presentará
15 una disminución de no más que aproximadamente el 5 % en el principal pico de la isoforma en comparación con una muestra de control. En determinadas realizaciones, una formulación farmacéutica estable presentará una disminución de no más que entre aproximadamente un 3 % y aproximadamente un 5 % en el principal pico de la isoforma en comparación con una muestra de control. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica estable
20 presentará una disminución de no más que aproximadamente un 4 %, una disminución de no más que aproximadamente un 3 %, una disminución de no más que aproximadamente un 2 %, una disminución de no más que aproximadamente un 1 %, una disminución de no más que aproximadamente un 0,5 % en el principal pico de la isoforma en comparación con una muestra de control.

25 En determinadas realizaciones, la estabilidad de la formulación farmacéutica se mide utilizando detección de partículas subvisibles por oscurecimiento de la luz ("HIAC"). Un sistema electrónico de conteo de partículas de transmisión por líquido (HIAC/Royco 9703 o equivalente) que contienen un sensor de oscurecimiento de la luz (HIAC/Royco HRLD-150 o equivalente) con un muestreador de líquidos cuantifica el número de partículas y su intervalo de tamaño en
30 una determinada muestra de prueba. Cuando las partículas se encuentran en un pasaje líquido entre la fuente ligera y el detector, disminuyen o "oscurecen" el haz de luz que llega al detector. Cuando la concentración de partículas se encuentra dentro del rango normal del sensor, estas partículas se detectan una por una. El pasaje de cada partícula a través de la zona de detección reduce la luz incidente en el fotodetector y la salida de tensión del fotodetector se reduce

momentáneamente. Los cambios en el voltaje se registran como pulsos eléctricos que se convierten mediante el instrumento en el número de partículas presentes. El método es no específico y mide las partículas independientemente de su origen. Los tamaños de partícula monitorizados generalmente son 10 μm y 25 μm . En el caso de HIAC, una formulación farmacéutica estable presentará no más de 6000 partículas de 10 μm por contenedor (o unidad), en comparación con una muestra de control. En determinadas realizaciones, una formulación farmacéutica estable presentará no más de 5000, no más de 4000, no más de 3000, no más de 2000, no más de 1000 partículas de 10 μm por contenedor (o unidad) en comparación con una muestra de control. En otras realizaciones, una formulación farmacéutica estable presentará no más de 600 partículas de 25 μm por contenedor (o unidad), en comparación con una muestra de control. En determinadas realizaciones, una formulación farmacéutica estable presentará no más de 500, no más de 400, no más de 300, no más de 200, no más de 100, no más de 50 partículas de 25 μm por contenedor (o unidad) en comparación con una muestra de control.

En determinadas realizaciones, la estabilidad de la formulación farmacéutica se mide utilizando evaluación visual. La evaluación visual es un método cuantitativo utilizado para describir las características físicas visibles de una muestra. Se observa la muestra contra un fondo negro y/o blanco en una cabina de inspección, según de la característica que se evalúa (p. ej., color, transparencia, presencia de partículas o materia externa). Las muestras también se observan contra un patrón de referencia opalescente y patrones de referencia de colores. En el caso de evaluación visual, una formulación farmacéutica estable no presentará ningún cambio significativo en el color, transparencia, presencia de partículas o materia externa en comparación con una muestra de control.

Un aspecto de la presente invención es una formulación farmacéutica que comprende:

- (i) entre aproximadamente 70 mg/ml y aproximadamente 250 mg/ml de proteína de unión a antígenos para PCSK9; (ii) entre aproximadamente 0,05 mM y aproximadamente 40 mM de un tampón, por ejemplo el acetato de sodio ("NaOAC") sirve como un agente tamponante; (iii) entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 5 % de prolina, arginina, lisina, metionina o taurina (también conocido como ácido 2-aminoetanosulfónico) y/o entre el 0,5 % y aproximadamente el 5 % de alcohol bencílico que sirve como un agente estabilizante; y (iv) entre aproximadamente el 0,004 % y aproximadamente el 10 % p/v de la formulación de un surfactante no iónico (incluso, entre otros, polisorbato-80, polisorbato-60, polisorbato-40 y polisorbato-20); en donde dicha formulación tiene un pH en el intervalo de entre aproximadamente 4,0 y 6,0. En determinadas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas de

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

Un aspecto de la presente invención es una formulación farmacéutica que comprende (i) al menos entre aproximadamente 70 mg/ml y aproximadamente 250 mg/ml de un anticuerpo anti-PCSK9; (ii) entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 20 mM de un tampón, por ejemplo NAOAC; (iii) entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 10 % p/v de la formulación comprende un polihidroxi hidrocarburo, por ejemplo sorbitol, o un disacárido, por ejemplo sucrosa; y (iv) entre aproximadamente el 0,004 % y aproximadamente el 10 % p/v de la formulación de un surfactante, por ejemplo polisorbato 20 o polisorbato 80; en donde dicha formulación tiene un pH en el intervalo de entre aproximadamente 4,8 y 5,8; y en donde la formulación farmacéutica opcionalmente comprende entre aproximadamente 80 mM y aproximadamente 300 mM de prolina, arginina, lisina, metionina o taurina y/o entre el 0,5 % y aproximadamente el 5 % de alcohol bencílico que sirve para reducir la viscosidad. En otras realizaciones, las formulaciones farmacéuticas de esta invención comprenden (i) al menos entre aproximadamente 70 mg/ml y aproximadamente 250 mg/ml del anticuerpo anti-PCSK9; (ii)

aproximadamente 10 mM de NAOAC; (iii) aproximadamente el 9 % de sucrosa; y (iv) aproximadamente el 0,004 % de polisorbato 20, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5,2. En otras realizaciones, las formulaciones farmacéuticas de esta invención comprenden (i) al menos aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml de un anticuerpo anti-PCSK9; (ii) aproximadamente 15 mM de NAOAC; (iii) aproximadamente el 9 % de sucrosa; y (iv) aproximadamente el 0,01 % de polisorbato 20, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5,2. En otras realizaciones, las formulaciones farmacéuticas de esta invención comprenden (i) al menos aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml de un anticuerpo anti-PCSK9; (ii) aproximadamente 20 mM de NAOAC; (iii) aproximadamente el 9 % de sucrosa; y (iv) aproximadamente el 0,01 % de polisorbato 20, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5,2. En otras realizaciones, las formulaciones farmacéuticas de esta invención comprenden (i) al menos aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml de un anticuerpo anti-PCSK9; (ii) aproximadamente 10 mM de NAOAC; (iii) aproximadamente el 9 % de sucrosa; y (iv) aproximadamente el 0,01 % de polisorbato 80; y (v) aproximadamente 250 mM de prolina, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5.

Las formulaciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, combinar con otros agentes. En determinadas realizaciones, la terapia de combinación comprende una proteína de unión a antígenos que se puede unir a PCSK9, en combinación con al menos un agente anti colesterol. Los agentes incluyen, entre otros, formulaciones químicas, anticuerpos, regiones de unión a antígenos preparados sintéticamente *in vitro* y combinaciones y conjugados de estos. En determinadas realizaciones, un agente puede actuar como un agonista, antagonista, modulador alostérico o toxina. En determinadas realizaciones, un agente puede actuar para inhibir o estimular su diana (p. ej., activación o inhibición de la enzima o receptor) y promocionando así un aumento de la expresión del LDLR o disminuyendo los niveles de colesterol en suero.

En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígenos para PCSK9 se puede administrar antes, simultáneamente o posteriormente al tratamiento con un agente reductor de colesterol (colesterol total y/o en suero). En determinadas realizaciones, una

proteína de unión a antígenos para PCSK9 se puede administrar profilácticamente para evitar o mitigar el inicio de hipercolesterolemia, enfermedad cardíaca, diabetes y/o cualquiera de los trastornos relacionados con el colesterol. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígenos para PCSK9 se puede administrar para el tratamiento de una afección de hipercolesterolemia existente. En algunas realizaciones, la ABP retrasa el inicio del trastorno y/o los síntomas asociados al trastorno. En algunas realizaciones, se proporciona la ABP a un sujeto que carece de síntomas de cualquiera de los trastornos relacionados con el colesterol o un subconjunto de estos.

En determinadas realizaciones, se utiliza una proteína de unión a antígenos para PCSK9 con agentes terapéuticos particulares para tratar diversos trastornos relacionados con el colesterol, por ejemplo hipercolesterolemia. En determinadas realizaciones, considerando la afección y el nivel de tratamiento deseado, se pueden administrar dos, tres o más agentes. En determinadas realizaciones, se pueden proporcionar dichos agentes juntos mediante inclusión en la misma formulación. En determinadas realizaciones, se pueden proporcionar dichos agentes y una proteína de unión a antígenos para PCSK9 juntos mediante inclusión en la misma formulación. En determinadas realizaciones, dichos agentes se pueden formular por separado y proporcionar juntos mediante inclusión en un kit de tratamiento. En determinadas realizaciones, dichos agentes y una proteína de unión a antígenos para PCSK9 se pueden formular por separado y proporcionar juntos mediante inclusión en un kit de tratamiento. En determinadas realizaciones, dichos agentes se puede proporcionar por separado.

En determinadas realizaciones, se puede preparar una formulación que comprende una proteína de unión a antígenos para PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, para almacenamiento mediante la mezcla de la formulación seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, mencionado anteriormente) en forma de una solución acuosa o una torta liofilizada. Además, en determinadas realizaciones, se puede formular una formulación que comprende una proteína de unión a antígenos para PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, como un liofilizado utilizando excipientes adecuados.

En determinadas realizaciones, cuando se considera la administración parenteral, una formulación terapéutica puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos, que comprende una proteína de unión a antígenos para PCSK9 deseada, con o sin agentes terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, un vehículo para la inyección parenteral es agua destilada estéril en la que se formula una proteína de unión a antígenos para PCSK9, con o sin

al menos un agente terapéutico adicional, como una solución estéril, isotónica, debidamente conservada. En determinadas realizaciones, la preparación puede comprender la formulación de la molécula deseada con un agente, por ejemplo, microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (por ejemplo, ácido poliláctico o ácido poliglicólico),
5 perlas o liposomas, que pueden proporcionar una liberación controlada o progresiva del producto, que se puede administrar a través de inyección de depósito. En determinadas realizaciones, también se puede utilizar el ácido hialurónico y pueden tener el efecto de promover la duración progresiva en la circulación. En determinadas realizaciones, se pueden utilizar dispositivos de administración de fármacos implantables para introducir la molécula
10 deseada.

En determinadas realizaciones, se puede formular una formulación farmacéutica para la inhalación. En determinadas realizaciones, se puede formular una formulación que comprende una proteína de unión a antígenos para PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, como un polvo seco para la inhalación. En determinadas realizaciones, se
15 puede formular una formulación que comprende una proteína de unión a antígenos para PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, con un propulsor para la administración en aerosol. En determinadas realizaciones, las soluciones se pueden nebulizar. La administración pulmonar se describe adicionalmente en la solicitud de PCT n.º PCT/US94/001875, que describe la administración pulmonar de las proteínas modificadas
20 químicamente.

En determinadas realizaciones, una formulación farmacéutica puede comprender una cantidad eficaz de una proteína de unión a antígenos para PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. En determinadas realizaciones, a través de la disolución de
25 las pastillas en agua estéril o en otro vehículo adecuado, se pueden preparar soluciones en forma de dosis unitarias. En determinadas realizaciones, los excipientes adecuados incluyen, entre otros, diluyentes inertes, por ejemplo, carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina o acacia; o agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

30 Otras formulaciones farmacéuticas resultarán evidentes para los entendidos en la técnica, inclusive formulaciones que comprenden proteínas de unión a antígenos para PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en formulaciones de administración controlada o progresiva. En determinadas realizaciones, las técnicas para la formulación de muchos otros medios de administración controlada o progresiva, por ejemplo, los portadores de

liposomas, las micropartículas bioerosionables, las perlas porosas y las inyecciones de depósito, también son conocidas por los entendidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la solicitud de PCT N°. PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de las micropartículas poliméricas porosas para la administración de formulaciones farmacéuticas. En determinadas realizaciones, las preparaciones de liberación progresiva pueden comprender matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos con forma, p. ej., de películas o microcápsulas. Las matrices de liberación progresiva pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilácticos (3.773.919 estadounidense y EP 058,481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman y col., Biopolymers, 22: 547-556 (1983)), poli (2-hidroxietilmetacrilato) (Langer y col., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981) y Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)), acetato de etilenvinilo (Langer y col., mencionado anteriormente) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133,988). En determinadas realizaciones, las formulaciones de liberación progresiva también pueden comprender liposomas que se pueden preparar a través de cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Eppstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 82: 3688-3692 (1985); EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

La formulación farmacéutica que se utilizará para la administración *in vivo* típicamente es estéril. En determinadas realizaciones, esto puede llevar a cabo por filtración, a través de membranas de filtración estériles. En determinadas realizaciones, cuando la formulación se liofiliza, la esterilización a través de este método se puede llevar adelante antes o después de la liofilización y la reconstrucción. En determinadas realizaciones, la formulación para la administración parenteral se puede almacenar en forma liofilizada o en una solución. En determinadas realizaciones, las formulaciones parenterales, generalmente, se colocan en un envase que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un frasco que tiene un tapón que puede perforarse con una aguja de inyección hipodérmica.

En determinadas realizaciones, una vez formulada la formulación farmacéutica, se puede almacenar en frascos estériles como una solución, una suspensión, un gel, una emulsión, un sólido o como un polvo deshidratado o liofilizado. En determinadas realizaciones, estas formulaciones se pueden almacenar en una forma lista para usar o en una forma (p. ej, liofilizada) que se reconstituye antes de la administración.

En determinadas realizaciones, una vez formulada la formulación farmacéutica, se puede almacenar en jeringas precargadas como una solución o suspensión en una forma lista para usar.

En determinadas realizaciones, se proporciona kits para producir una unidad de administración de dosis única. En determinadas realizaciones, el kit puede contener un primer

envase con una proteína seca y un segundo envase con una formulación acuosa. En determinadas realizaciones, se incluyen kits que contienen jeringas precargadas de una o de varias cámaras (p. ej., jeringas líquidas y liojeringas).

5 En determinadas realizaciones, la cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende una proteína de unión a antígenos para PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, que se empleará terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y de los objetivos terapéuticos. El entendido en la técnica comprenderá que los niveles de dosis adecuados para el tratamiento, de acuerdo con determinadas realizaciones, variará en función, en parte, de la molécula administrada, de la indicación para la cual se utiliza una proteína de
10 unión a antígenos para PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o la afección (la edad y la salud general) del paciente. En determinadas realizaciones, el médico puede titular la dosis y modificar la vía de administración para obtener un efecto terapéutico óptimo.

15 En determinadas realizaciones, la formulación se puede administrar localmente a través del implante de una membrana, esponja u otro material adecuado que absorbió o en el que se encapsuló la molécula deseada. En determinadas realizaciones, cuando se utiliza un dispositivo de implante, el dispositivo se puede implantar en cualquier tejido u órgano adecuado y la administración de la molécula deseada puede ser por difusión, por bolo de liberación
20 programada o por administración continua.

Regímenes de dosis y dosificación

Se puede administrar cualquiera de las proteínas de unión a antígenos para PCSK9
ilustradas en la tabla 2 y en las figuras 2 y/o 3 y/o las figuras 48A y 48B a un paciente de acuerdo con los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones, las proteínas de
25 unión a antígenos para PCSK9 incluyen 21B12, 26H5, 31H4, 8A3, 11F1 o 8A1.

La cantidad de una proteína de unión a antígenos para PCSK9 (p. ej., un anticuerpo anti-PCSK9) administrada a un paciente de acuerdo con los métodos de la presente invención, generalmente, es una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad de ABP se puede expresar en términos de miligramos de anticuerpo (es decir, mg) o miligramos de anticuerpos por
30 kilogramo de peso corporal del paciente (es decir, mg/kg). En determinadas realizaciones, una dosificación típica de una proteína de unión a antígenos PCSK9 puede oscilar de aproximadamente 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más de proteína de unión a antígenos para PCSK9. En determinadas realizaciones, la dosificación puede oscilar de aproximadamente 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o de 1 µg/kg hasta

- aproximadamente 100 mg/kg; o de 5 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de proteína de unión a antígenos para PCSK9; o entre 1 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg de proteína de unión a antígenos para PCSK9; o entre 2 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg de proteína de unión a antígenos para PCSK9; o entre 2 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg de proteína de unión a antígenos para PCSK9.

En determinadas realizaciones, la cantidad (o dosis) de proteína de unión a antígenos para PCSK9 puede oscilar de al menos aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 1400 mg; o entre aproximadamente 14 mg y aproximadamente 1200 mg; entre aproximadamente 14 mg y aproximadamente 1000 mg; entre aproximadamente 14 mg y aproximadamente 800 mg; entre aproximadamente 14 mg y aproximadamente 700 mg; entre aproximadamente 14 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 20 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 70 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 80 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 90 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 480 mg, entre aproximadamente 105 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 110 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 115 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 120 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 125 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 130 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 135 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 140 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 145 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 150 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 160 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 170 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 180 mg y aproximadamente 480 mg entre aproximadamente 190 mg y aproximadamente 480 mg entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 210 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 220 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 230 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 240 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 250 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 260 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 270 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 280 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 290 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 310 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 320 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 330 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 340 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 350 mg y aproximadamente 480 mg; entre

aproximadamente 360 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 370 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 380 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 390 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 410 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 420 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 430 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 440 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 450 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 460 mg y aproximadamente 480 mg; entre aproximadamente 470 mg y aproximadamente 480 mg de proteína de unión a antígenos para PCSK9.

En determinadas realizaciones, la frecuencia de dosificación considerará los parámetros farmacocinéticos de una proteína de unión a antígenos para PCSK9 y/o cualquier agente terapéutico adicional en la formulación utilizada. En determinadas realizaciones, un médico administrará la formulación hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado. En determinadas realizaciones, la formulación se puede administrar como una dosis única o como dos, tres, cuatro o más dosis (que pueden contener la misma cantidad de la molécula deseada o no) en el tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implante o catéter. La formulación también se puede administrar por vía subcutánea o intravenosa con una aguja o jeringa estándar. Además, con respecto a la administración subcutánea, los dispositivos de administración tipo bolígrafos, así como dispositivos de administración autoinyectores, tienen aplicaciones en la administración de una formulación farmacéutica de la presente invención. Los entendidos en la técnica perfeccionan más la dosis adecuada de forma rutinaria y dicha tarea se encuentra dentro del ámbito de tareas que realizan habitualmente. En determinadas realizaciones, las dosis adecuadas se pueden determinar a través del uso de los datos de la respuesta a la dosis adecuados. En algunas realizaciones, la cantidad y frecuencia de administración puede considerar el nivel de colesterol deseado (total y/o en suero) que se debe obtener y el nivel de colesterol presente en el sujeto, el nivel de LDL y/o los niveles de LDLR, todos los cuales se pueden obtener a través de métodos que los entendidos en la técnica conocen.

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

En otras realizaciones, se administra una dosis de al menos aproximadamente 70 mg,

o hasta aproximadamente 100 mg; hasta aproximadamente 105 mg, hasta aproximadamente 110 mg; hasta aproximadamente 115 mg, hasta aproximadamente 120 mg; hasta aproximadamente 140 mg; hasta aproximadamente 160 mg; hasta aproximadamente 200 mg; hasta aproximadamente 250 mg; hasta 280 mg; hasta 300 mg; hasta 350 mg; hasta 400 mg; o hasta 420 mg de una proteína de unión a antígenos para PCSK9 una vez cada dos semanas (Q2W) a un paciente que lo necesita.

En otras realizaciones, se administra una dosis de al menos aproximadamente 250 mg; o hasta aproximadamente 280 mg; hasta aproximadamente 300 mg; hasta aproximadamente 350 mg; hasta aproximadamente 400 mg; hasta aproximadamente 420 mg; hasta aproximadamente 450 mg; o hasta aproximadamente 480 mg de una proteína de unión a antígenos para PCSK9 una vez cada cuatro semanas (o una vez al mes) a un paciente que lo necesita.

En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 15 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero.

En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 20 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 25 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 30 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 40 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 65 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 70 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 75 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 80 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 85 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 90 %.

En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 15 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10

días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

5 En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 20 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

10 En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 25 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

15 En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 30 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

20 En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 35 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

25 En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 40 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos

aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

- 5 En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 45 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos
10 aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

- En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 50 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos
15 aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

- En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos
20 aproximadamente el 55 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente
25 31 días en comparación con un nivel predosis.

- En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 60 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10
30 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

 En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 65 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y

la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

5 En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 70 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

10 En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 75 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

15 En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 80 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

20 En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 85 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

25 En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos

aproximadamente el 90 %, en comparación con un nivel predosis de colesterol LDL en suero y la reducción se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en comparación con un nivel predosis.

Determinadas aplicaciones terapéuticas

Como apreciarán los entendidos en la técnica, los trastornos que se relacionan, implican o pueden ser influenciados por un colesterol variado, LDL, LDLR, PCSK9, VLDL-C, apoproteína B ("ApoB"), lipoproteína A ("Lp(a)"), triglicéridos, HDL-C, no-HDL-C y los niveles de colesterol total se pueden abordar por las proteínas de unión a antígenos para PCSK9 descritas en la presente invención. En un aspecto, se pueden utilizar proteínas de unión a antígenos para PCSK9 en métodos para tratar y/o evitar y/o reducir el riesgo de trastornos que se relacionan con los niveles de colesterol en suero elevados o en los cuales los niveles de colesterol en suero elevados son relevantes. En un aspecto, se pueden utilizar proteínas de unión a antígenos para PCSK9 en métodos para tratar y/o evitar y/o reducir el riesgo de trastornos que se relacionan con los valores de PCSK9 elevados o en los cuales los valores de PCSK9 elevados son relevantes. En un aspecto, se pueden utilizar proteínas de unión a antígenos para PCSK9 en métodos para tratar y/o evitar y/o reducir el riesgo de trastornos que se relacionan con los niveles de colesterol total elevados o en los cuales los niveles de colesterol total elevados son relevantes. En un aspecto, se pueden utilizar proteínas de unión a antígenos para PCSK9 en métodos para tratar y/o evitar y/o reducir el riesgo de trastornos que se relacionan con los niveles de colesterol no-HDL elevados o en los cuales los niveles de colesterol no-HDL elevados son relevantes. En un aspecto, se pueden utilizar proteínas de unión a antígenos para PCSK9 en métodos para tratar y/o evitar y/o reducir el riesgo de trastornos que se relacionan con los niveles de ApoB elevados o en los cuales los niveles de ApoB elevados son relevantes. En un aspecto, se pueden utilizar proteínas de unión a antígenos para PCSK9 en métodos para tratar y/o evitar y/o reducir el riesgo de trastornos que se relacionan con los niveles de Lp(a) elevados o en los cuales los niveles de Lp(a) elevados son relevantes. En un aspecto, se pueden utilizar proteínas de unión a antígenos para PCSK9 en métodos para tratar y/o evitar y/o reducir el riesgo de trastornos que se relacionan con los niveles de triglicéridos elevados o en los cuales los niveles de triglicéridos elevados son relevantes. En un aspecto, se pueden utilizar proteínas de unión a antígenos para PCSK9 en métodos para tratar y/o evitar y/o reducir el riesgo de trastornos que se relacionan con los niveles de VLDL-C elevados o en los cuales los

niveles de VLDL-C elevados son relevantes.

En un aspecto, se utiliza una proteína de unión a antígenos para PCSK9 para modular los niveles de colesterol LDL en suero en un paciente. En algunas realizaciones, se utiliza la proteína de unión a antígenos para PCSK9 para disminuir la cantidad de colesterol LDL en suero desde un nivel anormalmente alto o incluso un nivel normal. En determinadas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 30 %. En determinadas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 35 %. En determinadas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 40 %. En determinadas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 45 %. En determinadas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En determinadas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 65 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 70 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 75 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 80 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 85 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol LDL en suero se reduce en al menos aproximadamente el 90 %.

En un aspecto, se utiliza una proteína de unión a antígenos para PCSK9 para modular los valores de PCSK9 en un paciente. En determinadas realizaciones, la proteína de unión a antígenos para PCSK9 es neutralizante. En algunas realizaciones, se utiliza la proteína de unión a antígenos para PCSK9 para disminuir los valores de PCSK9 desde un nivel anormalmente alto o incluso un nivel normal. En algunas realizaciones, el valor de PCSK9 en suero se reduce en al menos aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones, el valor de PCSK9 en suero se reduce en al menos aproximadamente el 65 %. En algunas realizaciones, el valor de PCSK9 en suero se reduce en al menos aproximadamente el 70 %. En algunas realizaciones, el valor de PCSK9 en suero se reduce en al menos aproximadamente el 75 %. En algunas realizaciones, el valor de PCSK9 en suero se reduce en al menos aproximadamente el 80 %. En algunas realizaciones, el valor de PCSK9 en suero se reduce en al menos aproximadamente el 85 %. En algunas realizaciones, el valor de PCSK9 en suero se reduce en al menos aproximadamente el 90 %.

En un aspecto, se utiliza una proteína de unión a antígenos para PCSK9 para modular el nivel de colesterol total en un paciente. En determinadas realizaciones, la proteína de unión a antígenos para PCSK9 es neutralizante. En algunas realizaciones, se utiliza la proteína de unión a antígenos para PCSK9 para disminuir la cantidad de colesterol total desde un nivel anormalmente alto o incluso un nivel normal. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 20 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 25 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 30 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 35 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 40 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 45 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol total se reduce en al menos aproximadamente el 60 %.

En un aspecto, se utiliza una proteína de unión a antígenos para PCSK9 para modular el nivel de colesterol no-HDL en un paciente. En determinadas realizaciones, la proteína de unión a antígenos para PCSK9 es neutralizante. En algunas realizaciones, se utiliza la proteína de unión a antígenos para PCSK9 para disminuir el colesterol no-HDL desde un nivel anormalmente alto o incluso un nivel normal. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 30 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 35 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 40 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 65 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 70 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 75 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 80 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no-HDL se reduce en al menos aproximadamente el 85 %.

En un aspecto, se utiliza una proteína de unión a antígenos para PCSK9 para modular los niveles de ApoB en un paciente. En determinadas realizaciones, la proteína de unión a

antígenos para PCSK9 es neutralizante. En algunas realizaciones, se utiliza la proteína de unión a antígenos para PCSK9 para disminuir la cantidad de ApoB desde un nivel anormalmente alto o incluso un nivel normal. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 25 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 30 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 35 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 40 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 45 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 65 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 70 %. En algunas realizaciones, el nivel de ApoB se reduce en al menos aproximadamente el 75 %.

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

Como apreciarán los entendidos en la técnica, las proteínas de unión a antígenos para PCSK9 de la presente invención pueden ser útiles terapéuticamente para tratar y/o prevenir

trastornos relacionados con el colesterol. En algunas realizaciones, un "trastorno relacionado con el colesterol" (que incluye "trastornos relacionados con el colesterol en suero") incluye uno cualquiera o más de los siguientes: hipercolesterolemia familiar, hipercolesterolemia no familiar, hiperlipidemia, enfermedad cardíaca, síndrome metabólico, diabetes, enfermedad cardíaca coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad cardiovascular, mal de Alzheimer y, generalmente, dislipidemias, que se pueden manifestar, por ejemplo, por un colesterol en suero total elevado, LDL elevadas, triglicéridos elevados, VLDL elevadas y/o HDL bajas. Algunos ejemplos no exhaustivos de dislipidemias primarias y secundarias que se pueden tratar utilizando una ABP, ya sea sola o en combinación con uno o más agentes diferentes, incluyen síndrome metabólico, diabetes mellitus, hiperlipidemia familiar combinada, hipertrigliceridemia familiar, hipercolesterolemias familiares, incluso hipercolesterolemia heterocigótica, hipercolesterolemia homocigótica, apolipoproteína B-100 defectuosa familiar; hipercolesterolemia poligénica; enfermedad de eliminación de remanentes, deficiencia de la lipasa hepática; dislipidemia secundaria a cualquiera de los siguientes: indiscreción dietética, hipotiroidismo, fármacos incluyendo terapia con progestina y estrógeno, betabloqueadores y diuréticos tiazídicos; síndrome nefrótico, insuficiencia renal crónica, síndrome de Cushing, cirrosis biliar primaria, enfermedades de almacenamiento de glucógeno, hepatoma, colestasis, acromegalia, insulinoma, deficiencia de la hormona del crecimiento aislado y hipertrigliceridemia inducida por el alcohol. ABP también puede ser útil en la prevención o tratamiento de enfermedades ateroscleróticas, por ejemplo muerte cardiovascular, muerte no cardiovascular o por cualquier causa, enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad arterial periférica, accidente cerebrovascular (isquémico y hemorrágico), angina pectoris o enfermedad cerebrovascular y síndrome coronario agudo, infarto de miocardio y angina inestable. En algunas realizaciones, la ABP es útil en la reducción del riesgo de: ataques cardíacos fatales y no fatales, accidentes cerebrovasculares mortales y no mortales, determinados tipos de cirugía de corazón, hospitalización por insuficiencia cardíaca, dolor en el pecho en pacientes con enfermedad cardíaca, y/o eventos cardiovasculares debido a la enfermedad cardíaca establecida, por ejemplo ataque al corazón previo, cirugía de corazón previa, y/o dolor en el pecho con evidencia de obstrucción de las arterias y/o enfermedad vascular relacionada con el trasplante. En algunas realizaciones, la ABP es útil en la prevención o reducción del riesgo cardiovascular debido a CRP elevada o hsCRP. En algunas realizaciones, se pueden utilizar la ABP y los métodos para reducir el riesgo de eventos cardiovasculares recurrentes.

Como apreciarán los entendidos en la técnica, las enfermedades y los trastornos que

generalmente se pueden abordar (ya sea tratar o prevenir) a través del uso de la estatinas también se pueden beneficiar de la aplicación de las presentes proteínas de unión a antígenos. Además, en algunas realizaciones, los trastornos y enfermedades que se pueden beneficiar de la prevención de la síntesis de colesterol o el aumento de la expresión de LDLR también se pueden tratar a través de diversas realizaciones de las proteínas de unión a antígenos. Además, como apreciarán los entendidos en la técnica, el uso de los anticuerpos anti-PCSK9 puede ser especialmente útil en el tratamiento de diabetes. No solamente la diabetes es un factor de riesgo para la enfermedad cardíaca coronaria, sino que la insulina aumenta la expresión de PCSK9. Es decir, las personas con Diabetes tienen niveles elevados de lípidos en el plasma (lo que puede estar relacionado a los niveles altos de PCSK9) y se pueden beneficiar de la disminución de esos niveles. Esto se generalmente se plantea más detalladamente en Costet y col. ("Hepatic PCSK9 Expression is Regulated by Nutritional Status via Insulin and Sterol Regulatory Element-binding Protein 1C", J. Biol. Chem., 281: 6211-6218, 2006), cuya totalidad se incorpora en el presente por referencia.

En algunas realizaciones, se administra la proteína de unión a antígenos a los que tienen diabetes mellitus, aneurisma aórtico abdominal, aterosclerosis y/o enfermedad vascular periférica para disminuir sus niveles de colesterol en suero a un nivel más seguro. En algunas realizaciones, se administra la proteína de unión a antígenos a pacientes en riesgo de desarrollo de cualquiera de los trastornos descritos en el presente. En algunas realizaciones, se administran las ABP a sujetos que fuman, o solían fumar (es decir, ex fumadores), que tienen hipertensión o una historia familiar de ataques cardíacos tempranos.

En algunas realizaciones, se le administra a un sujeto una ABP si están en un riesgo moderado o alto según las metas de tratamiento de 2004 NCEP. En algunas realizaciones, la ABP se administra a un sujeto si el nivel de colesterol LDL del sujeto es mayor que 160 mg/dl. En algunas realizaciones, la ABP se administra si los el nivel de colesterol LDL en los sujetos es mayor que 130 (y tienen un riesgo moderado o moderadamente alto de acuerdo con las metas de tratamiento de 2004 NCEP). En algunas realizaciones, la ABP se administra si los el nivel de colesterol LDL en los sujetos es mayor que 100 (y tienen un riesgo alto o muy alto de acuerdo con las metas de tratamiento de 2004 NCEP). En algunas realizaciones, la ABP se administra si el nivel de colesterol LDL en los sujetos es mayor que 80 mg/dL. En algunas realizaciones, la ABP se administra si el nivel de colesterol LDL en los sujetos es mayor que 70 mg/dL.

Un médico podrá seleccionar las indicaciones de tratamiento adecuadas y los niveles de lípidos diana dependiendo del perfil individual de un paciente particular. Un estándar aceptado para guiar el tratamiento de hiperlipidemia es el Tercer informe del panel de expertos

del National Cholesterol Education Program (NCEP) en el Informe final de detección, evaluación y tratamiento del alto colesterol en sangre en adultos (panel de tratamiento de adultos III), National Institutes of Health, publicación de NIH N.º 02-5215 (2002), la publicación impresa del cual se incorpora en el presente por referencia en su totalidad.

5 En algunas realizaciones, se utilizan proteínas de unión a antígenos para PCSK9 para tratar o prevenir hipercolesterolemia, hiperlipidemia o dislipidemia y/o, por lo tanto, para preparar los medicamentos y/o para otros trastornos relacionados con el colesterol (por ejemplo los mencionados en el presente). En determinadas realizaciones, se utiliza una proteína de unión a antígenos para PCSK9 para tratar o prevenir las afecciones tales como
10 hipercolesterolemia en las cuales la actividad de PCSK9 es normal. En dichas afecciones, por ejemplo, la reducción de la actividad de PCSK9 de debajo de lo normal puede proporcionar un efecto terapéutico.

Terapias de combinación

15 En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar un trastorno relacionado con el colesterol, por ejemplo hipercolesterolemia, hiperlipidemia o dislipidemia, que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más proteínas de unión a antígenos para PCSK9 y otro agente terapéutico. En determinadas realizaciones, se administra una proteína de unión a antígenos para PCSK9 antes de la administración de al menos otro agente terapéutico. En determinadas realizaciones, se administra una proteína de
20 unión a antígenos para PCSK9 simultáneamente con la administración de al menos otro agente terapéutico. En determinadas realizaciones, se administra una proteína de unión a antígenos para PCSK9 después de la administración de al menos otro agente terapéutico.

25 Los agentes terapéuticos (además de la proteína de unión a antígenos), incluyen, entre otros, al menos otro agente reductor de colesterol (colesterol del cuerpo total y/o en suero). En algunas realizaciones, el agente aumenta la expresión de LDLR, se ha observado que aumenta los niveles de HDL en suero, disminuye los niveles de LDL o disminuye los niveles de triglicéridos. Agentes ejemplares incluyen, entre otros, estatinas (atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina), ácido nicotínico (niacina) (NIACOR, NIASPAN (niacina de liberación lenta), SLO-NIACIN
30 (niacina de liberación lenta), CORDAPTIVE (laropirant)), ácido fibríco (LOPID (Gemfibrozil), TRICOR (fenofibrato), secuestradores de ácidos biliares (QUESTRAN (colestiramina), colesevelam (WELCHOL), COLESTID (colestipol)), inhibidores de la absorción de colesterol (ZETIA (ezetimiba)), combinación de ácido nicotínico con estatina (ADVICOR (LOVASTATIN y NIASPAN), combinación de una estatina con un inhibidor de la absorción (VYTORIN (ZOCOR y

ZETIA) y/o agentes modificadores de lípidos. En algunas realizaciones, la ABP se combina con agonistas de PPAR gamma, agonistas de PPAR alfa/gamma, inhibidores de escualeno sintasa, inhibidores de CETP, antihipertensivos, agentes anti-diabéticos (por ejemplo sulfonilureas, insulina, análogos de GLP-1, inhibidores de DDPIV, p. ej., metformina), moduladores de ApoB, por ejemplo mipomersen, inhibidores de MTP y/o tratamientos de la arteriosclerosis obliterante. En algunas realizaciones, la ABP se combina con un agente que aumenta el nivel de proteína de LDLR en un sujeto, por ejemplo estatinas, determinadas citocinas como oncostatina M, estrógeno, y/o determinados ingredientes a base de hierbas tales como berberina. En algunas realizaciones, la ABP se combina con un agente que aumenta los niveles de colesterol en suero en un sujeto (por ejemplo determinados agentes antipsicóticos, determinados inhibidor de proteasa de, VIH, factores dietéticos, tales como alto contenido en fructosa, sacarosa, colesterol o ciertos ácidos grasos y ciertos agonistas y antagonistas de los receptores nucleares para RXR, RAR, LXR, FXR). En algunas realizaciones, la ABP se combina con un agente que aumenta el nivel de PCSK9 en un sujeto, por ejemplo estatinas y/o insulina. La combinación de los dos puede dar lugar a efectos secundarios no deseados de otros agentes que se mitigarán por la ABP.

En determinadas realizaciones, se puede utilizar una proteína de unión a antígenos para PCSK9 con al menos un agente terapéutico para la inflamación. En determinadas realizaciones, se puede utilizar una proteína de unión a antígenos para PCSK9 con al menos un agente terapéutico para un trastorno inmunológico. Agentes terapéuticos ejemplares para la inflamación y los trastornos inmunológicos incluyen, entre otros, inhibidores de ciclooxigenasa tipo 1 (COX-1) y ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2), moduladores de molécula pequeña de la proteína cinasa activada por mitógeno de 38 kDa (p38-MAPK); moduladores de molécula pequeña de moléculas intracelulares involucradas en las vías de inflamación, en donde dichas moléculas intracelulares incluyen, entre otros, jnk, IKK, NF- κ B, ZAP70 y Ick. Determinados agentes terapéuticos ejemplares para la inflamación se describe, p. ej., en C.A. Dinarello & L.L. Moldawer *Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis: A Primer for Clinicians* Third Edition (2001) Amgen Inc. Thousand Oaks, CA.

Aplicaciones de diagnóstico

En algunas realizaciones, la ABP se utiliza como una herramienta de diagnóstico. La ABP se puede utilizar para evaluar la cantidad de PCSK9 presente en una muestra y/o sujeto. Como apreciarán los entendidos en la técnica, dichas ABP necesitan ser ABP neutralizantes. En algunas realizaciones, la ABP de diagnóstico no es una ABP neutralizante. En algunas realizaciones, la ABP de diagnóstico se une a un epítopo diferente al que se une la ABP

neutralizante. En algunas realizaciones, las dos ABP no compiten entre sí.

En algunas realizaciones, las ABP divulgadas en el presente se utilizan o proporciona en un kit y/o método de ensayo para la detección de PCSK9 en tejidos mamíferos o células para detectar/diagnosticar una enfermedad o trastorno asociado con los cambios en los niveles de PCSK9. El kit comprende una ABP que se une a PCSK9 y medios para indicar la unión de la ABP con PCSK9, en caso de haber y opcionalmente niveles de proteína PCSK9. Se pueden utilizar diversos medios para indicar la presencia de una ABP. Por ejemplo, se pueden unir fluoróforos, otras sondas moleculares o enzimas a la ABP y se puede observar la presencia de la ABP de diversas maneras. El método para detectar dichos trastornos puede comprender el uso del kit, o simplemente el uso de una de las ABP divulgadas y para determinar si la ABP se une a PCSK9 en una muestra. Como apreciarán los entendidos en la técnica, los niveles altos o elevados de PCSK9 provocarán que grandes cantidades de ABP se unan a PCSK9 en la muestra. Por lo tanto, se puede utilizar el grado de unión de ABP para determinar cuánta PCSK9 hay en la muestra. Los sujetos o muestras con una cantidad de PCSK9 que es mayor que una cantidad predeterminada (p. ej., una cantidad o nivel que tendría una persona sin un trastorno relacionado con PCSK9) se pueden caracterizar por tener un trastorno mediado por PCSK9. En algunas realizaciones, se le administra la ABP a un sujeto que toma una estatina, para determinar si la estatina ha aumentado la cantidad de PCSK9 en el sujeto.

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

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos, incluidos los experimentos realizados y los resultados obtenidos, tienen el único propósito de ilustrar la invención y no se debe interpretar que limiten la presente invención.

EJEMPLO 1

Inmunización y titulación

Generación de anticuerpos anti-PCSK9 e hibridomas

Se criaron anticuerpos hasta la forma madura de PCSK9 (presentado como la secuencia de la FIG. 1A, con el prodominio subrayado), en ratones XenoMouse® (Abgenix, Fremont, CA), que son ratones que contienen genes de inmunoglobulina humana. Se utilizaron dos grupos de ratones XenoMouse®, el grupo 1 y el 2, para producir anticuerpos para PCSK9. El grupo 1 incluía ratones de la cepa XenoMouse® XMG2-KL, que produce anticuerpos IgG2 κ e IgG2

☐ complet

Se preparó PCSK9 mediante las técnicas recombinantes convencionales utilizando la secuencia de GenBank como referencia (NM_174936). El grupo 2 comprendía ratones de la cepa XenoMouse® XMG4-KL, que produce anticuerpos IgG4□ e IgG4

□ complet

También se inmunizaron los ratones del grupo 2 con PCSK9 humana.

5 A los ratones de ambos grupos, se les inyectó antígeno once veces, según el plan en la tabla 3. En las inmunizaciones iniciales, a cada ratón se le inyectó un total de 10 µg de antígeno por vía intraperitoneal en el abdomen. Los refuerzos posteriores son dosis de 5 ug y el método de inyección se alterna entre inyecciones intraperitoneales en el abdomen e inyecciones subcutáneas en la base de la cola. Para las inyecciones intraperitoneales, se
10 prepara el antígeno como una emulsión con TiterMax® Gold (Sigma, Cat # T2684) y para las inyecciones subcutáneas, se mezcla el antígeno con alumbre (fosfato de aluminio) y oligonucleótidos CpG. En las inyecciones de 2 a 8 y en la 10, a cada ratón se le inyectó un total de 5 µg de antígeno en el gel de alumbre adyuvante. Se administró una inyección final de 5 µg de antígeno por ratón en solución salina con tampón de fosfato y se administró en 2 sitios el
15 50 % IP en el abdomen y el 50 % SQ en la base de la cola. Los programas de inmunización se resumen en la tabla 3 que se muestra a continuación.

TABLA 3

Cepa de ratón	XMG2/kl	XMG4/kl
N.º de animales	10	10
inmunógeno	PCSK9-V5/His	PCSK9-V5/His
1º refuerzo	inyección IP 10 ug cada una	inyección IP 10 ug cada una
	Titermax Gold	Titermax Gold
2º refuerzo	inyección en la cola 5 ug cada una	inyección en la cola 5 ug cada una
	alumbre/CpG ODN	alumbre/CpG ODN
3º refuerzo	inyección IP 5 ug cada una	inyección IP 5 ug cada una
	Titermax Gold	Titermax Gold
4º refuerzo	inyección en la cola 5 ug cada una	inyección en la cola 5 ug cada una
	alumbre/CpG ODN	alumbre/CpG ODN
5º refuerzo	inyección IP 5 ug cada una	inyección IP 5 ug cada una
	Titermax Gold	Titermax Gold
6º refuerzo	inyección en la cola 5 ug cada una	inyección en la cola 5 ug cada una
	alumbre/CpG ODN	alumbre/CpG ODN
7º refuerzo	inyección IP 5 ug cada una	inyección IP 5 ug cada una
	Titermax Gold	Titermax Gold
8º refuerzo	inyección en la cola 5 ug cada una	inyección en la cola 5 ug cada una
	alumbre/CpG ODN	alumbre/CpG ODN
sangrado		
9º refuerzo	inyección IP 5 ug cada una	inyección IP 5 ug cada una
	Titermax Gold	Titermax Gold
10º refuerzo	inyección en la cola 5 ug cada una	inyección en la cola 5 ug cada una
	alumbre/CpG ODN	alumbre/CpG ODN
11º refuerzo	BIP 5 ug cada una	BIP 5 ug cada una
	PBS	PBS
recolección		

El protocolo utilizado para la titulación de los animales XenoMouse fue el siguiente: Se recubrieron placas de unión de medio 3368 Costar con neutravidin a 8 ug/ml (50 ul/pocillo) y se incubaron a 4 °C en 1XPBS/0,05 % de azida durante la noche. Se lavaron utilizando un lavado de 3 ciclos TiterTek con agua obtenida por ósmosis inversa. Se bloquearon las placas utilizando 250 ul de 1XPBS/1 % de leche y se incubaron durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró por lavado el bloqueador utilizando un lavado de 3 ciclos TiterTek con agua

obtenida por ósmosis inversa. Se capturó PCSK9 b-humana a 2 ug/ml en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ (diluyente de ensayo) 50 ul/pocillo y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó utilizando un lavado de 3 ciclos TiterTek con agua obtenida por ósmosis inversa. Para el anticuerpo primario, se titularon los sueros 1: 3 en duplicado a partir de 1: 100.

5 Esto se realizó en diluyente de ensayo 50 ul/pocillo y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó utilizando un lavado de 3 ciclos TiterTek con agua obtenida por ósmosis inversa. El anticuerpo secundario era IgG antihumana de cabra de Fc, HRP a 400 ng/ml en diluyente de ensayo a 50 ul/pocillo. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó utilizando un lavado de 3 ciclos TiterTek con agua obtenida por ósmosis inversa y se secó con golpecitos sobre toallas de papel. Para el sustrato, se utilizó solución one-step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) (50 ul/pocillo) y se dejó actuar durante 30 min a temperatura ambiente.

10

Los protocolos utilizados en los ensayos ELISA fueron los siguientes: para las muestras que contenían b-PCSK9 sin etiqueta de V5His, se empleó el siguiente protocolo: Se utilizaron placas de unión de medio 3368 Costar (Corning Life Sciences). Se recubrieron las

15 placas con neutravidin a 8 µg/ml en 1XPBS/0,05 % de azida, (50 µl/pocillo). Se incubaron las placas a 4 °C durante la noche. Se lavaron las placas utilizando una lavadora de placas M384 Titertek (Titertek, Huntsville, AL). Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se bloquearon las placas con 250 µl de 1XPBS/1 % de leche y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas M384. Se realizó un lavado de

20 3 ciclos. La captura fue b-hu PCSK9, sin una etiqueta de V5 y se añadió a 2 µg/ml en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ (40 µl/pocillo). Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se titularon los sueros 1: 3 en duplicado a partir de 1: 100 y la fila H quedó en blanco para los sueros. La titulación se realizó en diluyente de ensayo a un volumen de 50 µl/pocillo. Se incubaron las placas durante 1 hora a

25 temperatura ambiente. Después, se realizó un lavado de 3 ciclos. Se añadió IgG antihumana de cabra de Fc, HRP a 100 ng/ml (1: 4000) en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ (50 µl/pocillo) a la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas una vez más utilizando un lavado de 3 ciclos. Se secaron las placas con golpecitos sobre toallas de papel. Por último, se añadió 1 step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) (50 µl/pocillo) a la placa y se

30 desactivó con ácido clorhídrico 1N (50 µl/pocillo) después de 30 minutos a temperatura ambiente. Se leyeron inmediatamente las OD a 450 nm utilizando un lector de placas Titertek.

Los controles positivos para detectar PCSK9 unido a las placas fueron un receptor de LDL soluble (R&D Systems, Cat #2148LD/CF) y un anticuerpo anti-PCSK9 de conejo policlonal (Caymen Chemical #10007185) titulado 1: 3 en duplicado a partir de 3 µg/ml en diluyente de

ensayo. Se detectó LDLR con cabra anti LDLR (R&D Systems, Cat #AF2148) e IgGFc de conejo anti cabra, HRP a una concentración de 400 ng/ml; el policlonal de conejo se detectó con IgG anticonejo de cabra de Fc a una concentración de 400 ng/ml en diluyente de ensayo. El control negativo fueron sueros XMG2-KL y XMG4-KL vírgenes titulados 1: 3 en duplicado a partir de 1: 100 en diluyente de ensayo.

Para las muestras que contenían b-PCSK9 con una etiqueta de V5His, se empleó el siguiente protocolo: se utilizaron placas de unión de medio 3368 Costar (Corning Life Sciences). Se recubrieron las placas con neutravidin a 8 µg/ml en 1XPBS/0,05 % de azida, (50 µl/pocillo). Se incubaron las placas a 4 °C durante la noche. Se lavaron las placas utilizando una lavadora de placas M384 Titertek (Titertek, Huntsville, AL). Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se bloquearon las placas con 250 µl de 1XPBS/1 % de leche y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas M384. Se realizó un lavado de 3 ciclos. La captura fue b-hu PCSK9, con una etiqueta de V5 y se añadió a 2 µg/ml en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ (40 µl/pocillo). Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se titularon los sueros 1: 3 en duplicado a partir de 1: 100 y la fila H quedó en blanco para los sueros. La titulación se realizó en diluyente de ensayo a un volumen de 50 µl/pocillo. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas M384 que se operó con un lavado de 3 ciclos. Se añadió IgG antihumana de cabra de Fc, HRP a 400 ng/ml en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ a 50 µl/pocillo a la placa y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas una vez más utilizando un lavado de 3 ciclos. Se secaron las placas con golpecitos sobre toallas de papel. Por último, se añadió 1 step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) (50 µl/pocillo) a la placa y se desactivó la placa con ácido clorhídrico 1N (50 µl/pocillo) después de 30 minutos a temperatura ambiente. Se leyeron inmediatamente las OD a 450 nm utilizando un lector de placas Titertek.

El control positivo fue LDLR, conejo anti-PCSK9 titulado 1: 3 en duplicado a partir de 3 µg/ml en diluyente de ensayo. Se detectó LDLR con cabra anti-LDLR (R&D Systems, Cat #AF2148) e IgG anticabra de conejo de Fc, HRP a una concentración de 400 ng/ml; el poli de conejo se detectó con IgG anticonejo de cabra de Fc a una concentración de 400 ng/ml en diluyente de ensayo. Humano anti-His 1.2,3 y anti-V5 1.7.1 titulado 1: 3 en duplicado a partir de 1 µg/ml en diluyente de ensayo; ambos detectados con IgG antihumana de cabra de Fc, HRP a una concentración de 400 ng/ml en diluyente de ensayo. El control negativo fueron sueros XMG2-KL y XMG4-KL vírgenes titulados 1: 3 en duplicado a partir de 1: 100 en diluyente de ensayo.

Las titulaciones del anticuerpo contra PCSK9 humana se evaluaron mediante ensayo ELISA para los ratones inmunizados con el antígeno soluble según se describió. La tabla 4 resume los datos de ELISA e indica que algunos ratones resultaron específicos para PCSK9. Véase, p. ej., la tabla 4. Por lo tanto, al final del programa de inmunización, se seleccionaron 10 ratones (en negrita en la tabla 4) para la recolección y se aislaron esplenocitos y linfocitos de los bazos y de los ganglios linfáticos respectivamente, como se describió aquí.

TABLA 4
Resumen de resultados de ELISA

	Id. del animal	TITULACIÓN	Titulación
		b-hu PCSK9 (V5His) @ 2 ug/ml	b-hu PCSK9 @ 2 ug/ml
Grupo 1 - IgG2k/1	P175807	>72900 a OD 2,2	68359
	P175808	>72900 a OD 2,3	>72900 a OD 2,5
	P175818	>72900 a OD 3,2	>72900 a OD 3,0
	P175819	>72900 a OD 3,4	>72900 a OD 3,2
	P175820	>72900 a OD 2,4	>72900 a OD 2,5
	P175821	>72900 a OD 3,4	>72900 a OD 3,0
	P175830	>72900 a OD 2,6	>72900 a OD 2,5
	P175831	>72900 a OD 3,1	>72900 a OD 3,1
	P175832	>72900 a OD 3,8	>72900 a OD 3,6
	P175833	>72900 a OD 2,6	>72900 a OD 2,3
Grupo 2 - IgG4k/1	P174501	19369	17109
	P174503	31616	23548
	P174508	48472	30996
	P174509	23380	21628
	P174510	15120	9673
	P175773	19407	15973
	P175774	54580	44424
	P175775	60713	55667
	P175776	30871	22899
	P175777	16068	12532
G2 virgen		< 100 a OD 0,54	< 100 a OD 0,48
G4 virgen		< 100 a OD 1,57	< 100 a OD 1,32

10

EJEMPLO 2

Recuperación de linfocitos, aislamientos de células B, fusiones y generación de hibridomas

Este ejemplo describe cómo se recuperaron las células inmunológicas y cómo se generaron los hibridomas. Se sacrificaron determinados ratones inmunizados mediante dislocación cervical y se recolectaron los ganglios linfáticos con drenaje y se reservaron por cada cohorte. Se disociaron las células B del tejido linfático mediante molido en DMEM para

15

separar las células de los tejidos y se suspendieron las células en DMEM. Se contaron las células y se añadieron 0,9 ml de DMEM por 100 millones de linfocitos al sedimento de células para suspender nuevamente las células suavemente, pero de forma completa.

Se mezclaron los linfocitos con células de mieloma no secretor P3X63Ag8.653
5 obtenidas de ATCC, cat. # CRL 1580 (Kearney y col., (1979) *J. Immunol.* 123, 1548-1550) a una razón de 1: 4. La mezcla de células se sedimenta en forma de pellet suavemente mediante centrifugación a 400 x g durante 4 min. Después del decantado del sobrenadante, se mezclaron suavemente las células utilizando una pipeta de 1 ml. Se añadió lentamente una solución de PEG/DMSO precalentada de Sigma (cat# P7306) (1 ml por millón de células B) con agitación
10 suave durante 1 min seguido de 1 min de mezcla. Se añadieron la IDMEM precalentada (2 ml por millón de células B), DMEM sin glutamina, L-glutamina, pen/strep, MEM con aminoácidos no esenciales (todos de Invitrogen) durante 2 minutos con agitación suave. Por último, se añadió la IDMEM precalentada (8 ml por 10⁶ células B) durante 3 minutos.

Se centrifugaron las células fusionadas 400 x g durante 6 min y se suspendieron
15 nuevamente en 20 ml de medio de selección (DMEM (Invitrogen), 15 % FBS (Hyclone), complementado con L-glutamina, pen/strep, MEM con aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, 2-mercaptoetanol (todos de Invitrogen), HA-azaserina, Hipoxantina y OPI (oxaloacetato, piruvato, insulina bovina) (ambos de Sigma) e IL-6 (Boehringer Mannheim)) por millón de células B. Se incubaron las células durante 20-30 min a 37 °C, se suspendieron nuevamente en
20 200 ml de medio de selección y se cultivaron durante 3-4 días en un matraz T175 antes de colocarse en placas de 96 pocillos. Por lo tanto, se produjeron los hibridomas que producían proteínas de unión a antígenos para PCSK9.

EJEMPLO 3

Selección de anticuerpos PCSK9

25 El presente ejemplo describe cómo se caracterizaron y se seleccionaron las diversas proteínas de unión a antígenos para PCSK9. Se evaluó la unión de los anticuerpos secretados (producidos a partir de los hibridomas producidos en los ejemplos 1 y 2) para PCSK9. La selección de los anticuerpos se basó en los datos de unión y en la inhibición de la unión de PCSK9 con LDLR y en la afinidad. La unión a PCSK9 soluble fue analizada mediante ELISA,
30 como se describe a continuación. Se utilizó BIAcore® (resonancia de plasmón superficial) para cuantificar la afinidad de unión.

Detección primaria

Se realizó una detección primaria de los anticuerpos que se unen a PCSK9 natural. La detección primaria se realizó en dos recolecciones. La detección primaria comprendió un

ensayo ELISA y se realizó utilizando el siguiente protocolo:

Se utilizaron placas de 384 pocillos de unión de medio 3702 Costar (Corning Life Sciences). Se recubrieron las placas con neutravidin a una concentración de 4 µg/ml en 1XPBS/0,05 % de azida, a un volumen de 40 µl/pocillo. Se incubaron las placas a 4 °C durante la noche. Se lavaron las placas utilizando una lavadora de placas Titertek (Titertek, Huntsville, AL). Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se bloquearon las placas con 90 µl de 1XPBS/1 % de leche y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las placas. Nuevamente, se realizó lavado de 3 ciclos. La muestra de captura fue biotinilado-PCSK9, sin una etiqueta de V5 y se añadió a 0,9 µg/ml en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺, a un volumen de 40 µl/pocillo. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas Titertek que se operó con un lavado de 3 ciclos. Se transfirieron 10 µl de sobrenadante a 40 µl de 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ y se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Nuevamente, se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas Titertek que se operó con un lavado de 3 ciclos. Se añadieron 40 µl/pocillo de IgG antihumana de cabra de Fc POD a una concentración de 100 ng/ml (1: 4000) en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ a la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas una vez más utilizando un lavado de 3 ciclos. Por último, se añadieron 40 µl/pocillo de One-step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) a la placa y se desactivó con 40 µl/pocillo de ácido clorhídrico 1N después de 30 minutos a temperatura ambiente. Se leyeron inmediatamente las OD a 450 nm utilizando un lector de placas Titertek.

La detección primaria dio como resultado un total de 3104 hibridomas específicos de antígeno identificados a partir de las dos recolecciones. Basándose en la OD de ELISA más alta, 1500 hibridomas por recolección avanzaron, totalizando 3000 positivos.

Detección confirmatoria

Se evaluaron nuevamente los 3000 positivos en cuanto a la unión a PCSK9 natural para confirmar el establecimiento de los hibridomas estables. La detección se realizó del siguiente modo: se utilizaron placas de 384 pocillos de unión de medio 3702 Costar (Corning Life Sciences). Se recubrieron las placas con neutravidin a 3 µg/ml en 1XPBS/0,05 % de azida, a un volumen de 40 µl/pocillo. Se incubaron las placas a 4 °C durante la noche. Se lavaron las placas utilizando una lavadora de placas Titertek (Titertek, Huntsville, AL). Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se bloquearon las placas con 90 µl de 1XPBS/1 % de leche y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas M384. Se realizó un lavado de 3 ciclos. La muestra de captura fue b-PCSK9,

sin una etiqueta de V5 y se añadió a 0,9 µg/ml en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺, a un volumen de 40 µl/pocillo. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente, se lavaron las placas utilizando un lavado de 3 ciclos. Se transfirieron 10 µl de sobrenadante a 40 µl de 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ y se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Nuevamente, se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas Titertek que se operó con un lavado de 3 ciclos. Se añadieron 40 µl/pocillo de IgG antihumana de cabra de Fc POD a una concentración de 100 ng/ml (1: 4000) en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ a la placa y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas una vez más utilizando la lavadora de placas Titertek que se operó con un lavado de 3 ciclos. Por último, se añadieron 40 µl/pocillo de One-step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) a la placa y se desactivó con 40 µl/pocillo de ácido clorhídrico 1N después de 30 minutos a temperatura ambiente. Se leyeron inmediatamente las OD a 450 nm utilizando un lector de placas Titertek. Un total de 2441 positivos se repitieron en la segunda detección. Estos anticuerpos se utilizaron después en las detecciones posteriores.

15 Detección de reactividad cruzada del ratón

Se evaluó el panel de hibridomas en cuanto a la reactividad cruzada para PCSK9 de ratón para asegurarse de que los anticuerpos se podían unir a PCSK9 humana y de ratón. Se empleó el siguiente protocolo en la detección de reactividad cruzada: se utilizaron placas de 384 pocillos de unión de medio 3702 Costar (Corning Life Sciences). Se recubrieron las placas con neutravidin a 3 µg/ml en 1XPBS/0,05 % de azida, a un volumen de 40 µl/pocillo. Se incubaron las placas a 4 °C durante la noche. Se lavaron las placas utilizando una lavadora de placas Titertek (Titertek, Huntsville, AL). Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se bloquearon las placas con 90 µl de 1XPBS/1 % de leche y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas Titertek. Se realizó un lavado de 3 ciclos. La muestra de captura fue biotinilado-PCSK9 de ratón y se añadió a 1 µg/ml en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺, a un volumen de 40 µl/pocillo. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas Titertek que se operó con un lavado de 3 ciclos. Se transfirieron 50 µl de sobrenadante a las placas y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente, se lavaron las placas utilizando un lavado de 3 ciclos. Se añadieron 40 µl/pocillo de IgG antihumana de cabra de Fc POD a una concentración de 100 ng/ml (1: 4000) en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ a la placa y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas una vez más utilizando un lavado de 3 ciclos. Por último, se añadieron 40 µl/pocillo de One-step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) a la placa y se desactivó con

40 µl/pocillo de ácido clorhídrico 1N después de 30 minutos a temperatura ambiente. Se leyeron inmediatamente las OD a 450 nm utilizando un lector de placas Titertek. Se observó que 579 anticuerpos presentaron reactividad cruzada con PCSK9 de ratón. Estos anticuerpos se utilizaron después en las detecciones posteriores.

5 Detección de unión a mutante D374Y

La mutación de D374Y en PCSK9 ha sido documentada en la población humana (p. ej., Timms KM y col., "A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree", Hum. Genet. 114: 349-353, 2004). Para determinar si los anticuerpos eran específicos para la forma natural o también se unían a la forma D374Y de PCSK9, se evaluaron las muestras en cuanto a la unión a la secuencia de PCSK9 mutante que comprendía la mutación D374Y. El protocolo para la detección fue el siguiente: se utilizaron placas de 384 pocillos de unión de medio 3702 Costar (Corning Life Sciences) en la detección. Se recubrieron las placas con neutravidin a 4 µg/ml en 1XPBS/0,05 % de azida, a un volumen de 40 µl/pocillo. Se incubaron las placas a 4 °C durante la noche. Se lavaron las placas utilizando una lavadora de placas Titertek (Titertek, Huntsville, AL). Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se bloquearon las placas con 90 µl de 1XPBS/1 % de leche y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas Titertek. Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se recubrieron las placas con D374Y PCSK9 biotinilada humana a una concentración de 1 µg/ml en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas utilizando una lavadora de placas Titertek. Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se diluyó el sobrenadante de los cultivos de hibridoma de salida tardía 1: 5 en PBS/leche/Ca²⁺ (10 ml más 40 ml) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se titularon 40 µl/pocillo de PCSK9 antihumana de conejo (Cayman Chemical) y humana anti-His 1.2.3 1: 2 a 1 µg/ml en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ en las placas, que se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas utilizando una lavadora de placas Titertek. Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se añadieron 40 µl/pocillo de IgG antihumana de cabra de Fc, HRP a una concentración de 100 ng/ml (1: 4000) en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ a la placa y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron 40 µl/pocillo de IgG anticonejo de cabra de Fc, HRP a una concentración de 100 ng/ml (1: 4000) en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ a la placa y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas utilizando una lavadora de placas Titertek. Se realizó un lavado de 3 ciclos. Por último, se añadieron 40 µl/pocillo de One-step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) a la placa y se desactivó con 40 µl/pocillo de ácido clorhídrico 1N después de 30 minutos a temperatura ambiente. Se leyeron

inmediatamente las OD a 450 nm utilizando un lector de placas Titertek. Más del 96 % de los positivos para PCSK9 natural también se unieron al PCSK9 mutante.

Detección de bloqueo de ligando del receptor a gran escala

Para detectar los anticuerpos que bloquean la unión de PCSK9 a LDLR, se desarrolló un ensayo utilizando el PCSK9 mutante D374Y. Se utilizó el mutante para este ensayo porque tiene una mayor afinidad de unión a LDLR, lo que permite el desarrollo de un ensayo de bloqueo de ligando del receptor más sensible. Se empleó el siguiente protocolo en la detección del bloqueo de ligando del receptor: se utilizaron placas de 384 pocillos de unión de medio 3702 Costar (Corning Life Sciences) en la detección. Se recubrieron las placas con cabra anti-LDLR (R&D Cat #AF2148) a 2 µg/ml en 1XPBS/0,05 % de azida, a un volumen de 40 µl/pocillo. Se incubaron las placas a 4 °C durante la noche. Se lavaron las placas utilizando una lavadora de placas Titertek (Titertek, Huntsville, AL). Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se bloquearon las placas con 90 µl de 1XPBS/1 % de leche y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas Titertek. Se realizó un lavado de 3 ciclos. La muestra de captura fue LDLR (R&D, Cat #2148LD/CF) y se añadió a 0,4 µg/ml en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺, a un volumen de 40 µl/pocillo. Se incubaron las placas durante 1 hora y 10 minutos a temperatura ambiente. De forma simultánea, se incubaron 20 ng/ml de PCSK9 D374Y biotinilada humana con 15 microlitros de sobrenadante de hibridoma de salida en placas de polipropileno Nunc y la concentración de sobrenadante de salida se diluyó 1: 5. Se preincubaron las placas durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas Titertek que se operó con un lavado de 3 ciclos. Se transfirieron 50 µl/pocillo de la mezcla preincubada a las placas de ELISA recubiertas con LDLR y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Para detectar b-PCSK9 unida a LDLR, se añadieron 40 µl/pocillo de estreptavidina HRP a 500 ng/ml en diluyente de ensayo a las placas. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas utilizando una lavadora de placas Titertek. Se realizó un lavado de 3 ciclos. Por último, se añadieron 40 µl/pocillo de One-step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) a la placa y se desactivó con 40 µl/pocillo de ácido clorhídrico 1N después de 30 minutos a temperatura ambiente. Se leyeron inmediatamente las OD a 450 nm utilizando un lector de placas Titertek. La detección identificó 384 anticuerpos que bloquearon la interacción entre PCSK9 y el pocillo con LDLR, 100 anticuerpos bloquearon la interacción fuertemente (OD < 0,3). Estos anticuerpos inhibieron la interacción de unión de PCSK9 y de LDLR en más del 90 % (más del 90 % de inhibición).

Ensayo de unión del ligando del receptor sobre el subconjunto del bloqueador

Se repitió el ensayo de ligando del receptor utilizando la enzima mutante sobre el subconjunto de 384 miembros de neutralizadores identificado en el primer ensayo de inhibición de ligando del receptor a gran escala. Se utilizó el mismo protocolo en la detección del ensayo del subconjunto del bloqueador de 384 miembros que se empleó en la detección del bloqueo de ligando del receptor a gran escala. Esta detección de repetición confirmó los datos de la detección inicial.

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

Ensayo de unión del ligando del receptor de los bloqueadores que se unen a PCSK9 natural, pero no al D374Y mutante

En el panel inicial de 3000 sobrenadantes, 86 anticuerpos se unieron específicamente a PCSK9 natural y no al mutante huPCSK9(D374Y). Se evaluaron estos 86 sobrenadantes en cuanto a la capacidad de bloquear la unión de PCSK9 natural al receptor de LDLR. Se empleó el siguiente protocolo: se utilizaron placas de 384 pocillos de unión de medio 3702 Costar (Corning Life Sciences) en la detección. Se recubrieron las placas con anti-His 1.2.3 a 10 µg/ml en 1XPBS/0,05 % de azida, a un volumen de 40 µl/pocillo. Se incubaron las placas a 4 °C durante la noche. Se lavaron las placas utilizando una lavadora de placas Titertek (Titertek, Huntsville, AL). Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se bloquearon las placas con 90 µl de 1XPBS/1 % de leche y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas Titertek. Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se añadió LDLR (R&D Systems, #2148LD/CF o R&D Systems, #2148LD) a 5 µg/ml en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺, a un volumen de 40 µl/pocillo. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas Titertek que se operó con un lavado de 3 ciclos. De forma simultánea, se preincubó PCSK9 natural humana biotinilada con sobrenadante de hibridoma de salida en placas de polipropileno Nunc. Se transfirieron 22 µl de sobrenadante de hibridoma a 33 µl de b-PCSK9 a una concentración de 583 ng/ml en 1XPBS/1 % de leche/10 mM Ca²⁺ y se obtuvo una concentración final de b-PCSK9 = 350 ng/ml y el sobrenadante de salida en una dilución final de 1: 2,5. Se preincubaron las placas durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron 50 µl/pocillo de la mezcla preincubada a las placas de ELISA con LDLR capturado y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas utilizando la lavadora de placas Titertek. Se realizó un lavado de 3 ciclos. Se añadieron 40 µl/pocillo de estreptavidina HRP a 500 ng/ml en diluyente de ensayo a las placas. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas utilizando una lavadora de placas

Titertek. Se realizó un lavado de 3 ciclos. Por último, se añadieron 40 µl/pocillo de One-step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) a la placa y se desactivó con 40 µl/pocillo de ácido clorhídrico 1N después de 30 minutos a temperatura ambiente. Se leyeron inmediatamente las OD a 450 nm utilizando un lector de placas Titertek.

5 Resultados de la detección

Según los resultados de los ensayos descritos, se identificaron varias líneas de hibridoma como productoras de anticuerpos con las interacciones deseadas con PCSK9. Se utilizó una dilución limitada para aislar una cantidad manejable de clones de cada línea. Se designaron los clones por número de línea de hibridoma (p. ej. 21B12) y número de clon (p. ej. 21B12.1). En general, no se detectaron diferencias entre los diferentes clones de una línea específica mediante los ensayos funcionales descritos aquí. En algunos casos, se identificaron clones de una línea específica que se comportó de manera diferente en los ensayos funcionales, por ejemplo, se halló que 25A7.1 no bloqueó PCSK9/LDLR, pero 25A7.3 (denominado aquí como 25A7) fue neutralizante. Los clones aislados se expandieron en 50-100 ml de medio de hibridoma y se dejaron crecer hasta el agotamiento (es decir menos de aproximadamente el 10 % de viabilidad celular). Se determinaron la concentración y la potencia de los anticuerpos para PCSK9 en los sobrenadantes de esas culturas mediante ELISA y pruebas funcionales *in vitro*, como se describió aquí. Como resultado de la detección descrita aquí, se identificaron los hibridomas con el título más alto de anticuerpos para PCSK9. Los hibridomas seleccionados se muestran en las figuras 2A-3D y en la tabla 2.

EJEMPLO 4.1

Producción de anticuerpos IgG4 31H4 humanos a partir de hibridomas

Este ejemplo describe en general cómo se produjo una de las proteínas de unión a antígenos a partir de una línea de hibridoma. El trabajo de producción utilizó 50 ml de generación de sobrenadante de salida seguido de purificación de proteína A. Se utilizó la producción de Integra para el aumento en escala y se realizó posteriormente. Se cultivó la línea de hibridoma 31H4 en matraces T75 en 20 ml de medio (Integra Media, tabla 5). Cuando el hibridoma fue casi confluyente en los matraces T75, se transfirió a un matraz Integra (Integra Biosciences, Integra CL1000, cat# 90 005).

El matraz Integra es un matraz de cultivo celular que está dividido por una membrana en dos cámaras, una cámara pequeña y una cámara grande. Se colocó un volumen de 20-30 ml de células de hibridoma a una densidad celular mínima de 1×10^6 células por ml de la línea de hibridoma 31H4 en la cámara pequeña de un matraz Integra en medio Integra (véase la tabla 5 para conocer los componentes del medio Integra). Se colocó medio Integra solo (1 L) en las

cámaras grandes de los matraces Integra. La membrana que separa las dos cámaras es permeable a los nutrientes de bajo peso molecular, pero es impermeable a las células de hibridoma y a los anticuerpos producidos por dichas células. Por lo tanto, las células de hibridoma y los anticuerpos producidos por esas células de hibridoma fueron retenidos en la

5 cámara pequeña.

Después de una semana, se extrajo el medio de ambas cámaras del matraz Integra y se reemplazó por medio Integra nuevo. El medio recolectado de las cámaras pequeñas se retuvo por separado. Después de una segunda semana de cultivo, se recolectó nuevamente el medio de la cámara pequeña. Se combinó el medio recolectado de la semana 1 de la línea de

10 hibridoma con el medio recolectado de la semana 2 de la línea de hibridoma. Se centrifugó la muestra de medio recolectada resultante de la línea de hibridoma para eliminar las células y los residuos (15 minutos a 3000 rpm) y se filtró el sobrenadante resultante (0,22 µm). Se cargó medio acondicionado clarificado en una columna de proteína A-sefarosa. Opcionalmente, el medio se puede concentrar primero y cargar después a una columna de proteína A-sefarosa.

15 Se extrajeron las uniones no específicas mediante un lavado con PBS extensivo. Se recuperaron las proteínas de anticuerpo unidas en la columna de proteína A mediante elución de anticuerpo ácida convencional de las columnas de proteína A (como citrato 50 mM, pH 3,0). Se extrajeron las proteínas de anticuerpo acumuladas en la mezcla de proteína A y sefarosa mediante cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía de intercambio iónico de

20 unión sobre la resina intercambiadora de aniones como la resina Q Sefarosa. Las condiciones de IEX específicas para las proteínas 31H4 son Q-sefarosa HP a pH 7,8-8,0. Se eluyó el anticuerpo con un gradiente de NaCl de 10 mM-500 mM en 25 volúmenes de columna.

TABLA 5
Composición del medio

MEDIO INTEGRA
HSFM
10 % de suero con IgG ultra baja
2 mmol/L de L-glutamina
1 % de NEAA
4 g/L glucosa

25

EJEMPLO 4.2

Producción de anticuerpos IgG2 humana 31H4 recombinante a partir de células transfectadas

El presente ejemplo describe cómo se produjeron anticuerpos IgG2 31H4 a partir de

células transfectadas. Se transfectaron 293 células para expresión transitoria y células CHO para expresión estable con plásmidos que codifican las cadenas ligera y pesada de 31H4. Se recuperó el medio acondicionado de las células transfectadas mediante la extracción de las células y los residuos celulares. Se cargó medio acondicionado clarificado en una columna de proteína A-sefarosa. Opcionalmente, el medio se puede concentrar primero y cargar después a una columna de proteína A-sefarosa. Se extrajeron las uniones no específicas mediante un lavado con PBS extensivo. Se recuperaron las proteínas de anticuerpo unidas en la columna de proteína A mediante elución de anticuerpo ácida convencional de las columnas de proteína A (como citrato 50 mM, pH 3,0). Se extrajeron las proteínas de anticuerpo acumuladas en la mezcla de proteína A y sefarosa mediante cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía de intercambio iónico de unión sobre la resina intercambiadora de aniones como la resina Q Sefarosa. Las condiciones de IEX específicas para las proteínas 31H4 son Q-Sefarosa HP a pH 7,8-8,0. Se eluyó el anticuerpo con un gradiente de NaCl de 10 mM-500 mM en 25 volúmenes de columna.

15

EJEMPLO 5

Producción de anticuerpos IgG4 21B12 humanos a partir de hibridomas

El presente ejemplo describe cómo se produjeron anticuerpos IgG4 21B12 a partir de hibridomas. Se cultivó la línea de hibridoma 21B12 en matraces T75 en medio (Integra Media, tabla 5). Cuando los hibridomas fueron casi confluentes en los matraces T75, se transfirieron a matraces Integra (Integra Biosciences, Integra CL1000, cat# 90 005).

20

El matraz Integra es un matraz de cultivo celular que está dividido por una membrana en dos cámaras, una cámara pequeña y una cámara grande. Se colocó un volumen de 20-30 ml de células de hibridoma a una densidad celular mínima de 1×10^6 células por ml de la línea de hibridoma 31H4 en la cámara pequeña de un matraz Integra en medio Integra (véase la tabla 5 para conocer los componentes del medio Integra). Se colocó medio Integra solo (1 L) en las cámaras grandes de los matraces Integra. La membrana que separa las dos cámaras es permeable a los nutrientes de bajo peso molecular, pero es impermeable a las células de hibridoma y a los anticuerpos producidos por dichas células. Por lo tanto, las células de hibridoma y los anticuerpos producidos por esas células de hibridoma fueron retenidos en la cámara pequeña.

25

30

Después de una semana, se extrajo el medio de ambas cámaras del matraz Integra y se reemplazó por medio Integra nuevo. El medio recolectado de las cámaras pequeñas se retuvo por separado. Después de una segunda semana de cultivo, se recolectó nuevamente el medio de la cámara pequeña. Se combinó el medio recolectado de la semana 1 de la línea de

hibridoma con el medio recolectado de la semana 2 de la línea de hibridoma. Se centrifugó la muestra de medio recolectada resultante de la línea de hibridoma para eliminar las células y los residuos (15 minutos a 3000 rpm) y se filtró el sobrenadante resultante (0,22 µm). Se cargó medio acondicionado clarificado en una columna de proteína A-sefarosa. Opcionalmente, el medio se concentra primero y se carga después a una columna de proteína A-sefarosa. Se extrajeron las uniones no específicas mediante un lavado con PBS extensivo. Se recuperaron las proteínas de anticuerpo unidas en la columna de proteína A mediante elución de anticuerpo ácida convencional de las columnas de proteína A (como citrato 50 mM, pH 3,0). Se extrajeron las proteínas de anticuerpo acumuladas en la mezcla de proteína A y sefarosa mediante cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía de intercambio iónico de unión sobre la resina intercambiadora de aniones como la resina Q Sefarosa. Las condiciones de IEX específicas para las proteínas 21B12 son Q-Sefarosa HP a pH 7,8-8,0. Se eluyó el anticuerpo con un gradiente de NaCl de 10 mM-500 mM en 25 volúmenes de columna.

EJEMPLO 6

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

El presente ejemplo describe cómo se produjeron anticuerpos IgG2 21B12 a partir de células transfectadas. Se transfectaron células (293 células para expresión transitoria y células CHO para expresión estable) con plásmidos que codifican las cadenas ligera y pesada de 21B12. Se recuperó el medio acondicionado de las células de hibridoma mediante la extracción de las células y los residuos celulares. Se cargó medio acondicionado clarificado en una columna de proteína A-sefarosa. Opcionalmente, el medio se puede concentrar primero y cargar después a una columna de proteína A-sefarosa. Se extrajeron las uniones no específicas mediante un lavado con PBS extensivo. Se recuperaron las proteínas de anticuerpo unidas en la columna de proteína A mediante elución de anticuerpo ácida convencional de las columnas de proteína A (citrato 50 mM, pH 3,0). Se extrajeron las proteínas de anticuerpo acumuladas en la mezcla de proteína A y sefarosa mediante cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía de intercambio iónico de unión sobre la resina intercambiadora de cationes como la resina SP-Sefarosa. Las condiciones de IEX específicas para las proteínas 21B12 son Q-Sefarosa HP a pH 5,2. Se eluyeron los anticuerpos con 25 volúmenes de columna de tampón que contiene un gradiente de NaCl de 10 mM-500 mM en tampón acetato de sodio 20 mM.

EJEMPLO 7

Análisis de secuencia de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo

Las secuencias de ácidos nucleicos y las secuencias de aminoácidos para las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anteriores fueron determinadas por secuenciación de

nucleótidos (didesoxi) de Sanger. Se dedujeron las secuencias de aminoácidos para las secuencias de ácidos nucleicos. Las secuencias de ácidos nucleicos para los dominios variables se ilustran en las figuras 3E-3JJ.

Se determinaron las secuencias de ADNc para las regiones variables de cadena ligera lambda de 31H4, 21B12 y 16F12 y se divulgan como SEC. ID. N.º: 153, 95 y 105 respectivamente.

Se determinaron las secuencias de ADNc para las regiones variables de cadena pesada de 31H4, 21B12 y 16F12 y se divulgan como SEC. ID. N.º: 152, 94 y 104 respectivamente.

La región constante de cadena ligera lambda (SEC. ID. N.º: 156) y las regiones constantes de cadena pesada IgG2 e IgG4 (SEC. ID. N.º: 154 y 155) se muestran en la figura 3KK.

Se determinaron las secuencias de polipéptidos previstas de cada una de esas secuencias de ADNc. Se pronosticaron las secuencias de polipéptidos previstas para las regiones variables de cadena ligera lambda de 31H4, 21B12 y 16F12 y se divulgan como SEC. ID. N.º: 12, 23 y 35 respectivamente; se pronosticaron la región constante de cadena ligera lambda (SEC. ID. N.º: 156), las regiones variables de cadena pesada de 31H4, 21B12 y 16F12 y se divulgan como SEC. ID. N.º: 67, 49 y 79 respectivamente. Las regiones constantes de cadena pesada de IgG2 e IgG4 (SEC. ID. N.º: 154 y 155).

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

Basándose en los datos de las secuencias, se determinaron los genes de líneas germinales de los cuales se deriva cada región variable de cadena pesada o cadena ligera. La identidad de los genes de líneas germinales se indica junto a la línea de hibridoma correspondiente en las figuras 2A-3D y cada una está representada por un SEC. ID. N.º único. Las figuras 2A-3D también ilustran las secuencias de aminoácidos determinadas para los anticuerpos adicionales que se caracterizaron.

EJEMPLO 8

Caracterización de la unión de los anticuerpos a PCSK9

Habiendo identificado varios anticuerpos que se unen a PCSK9, se emplearon diversos enfoques para cuantificar y caracterizar mejor la naturaleza de la unión. En un aspecto del estudio, se realizó un análisis de afinidad Biacore. En otro aspecto del estudio, se realizó un análisis de afinidad KinExA®. Las muestras y los tampones empleados en estos estudios se muestran en la tabla 6 a continuación.

TABLA 6

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

Mediciones de afinidad BIAcore®

Se realizó el análisis de afinidad BIAcore® (dispositivo de resonancia de plasmón superficial, Biacore, Inc., Piscataway, NJ) de los anticuerpos 21B12 para PCSK9 descrito en este ejemplo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En resumen, los experimentos de resonancia de plasmón superficial se realizaron utilizando biosensores ópticos Biacore 2000 (Biacore, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se inmovilizó cada anticuerpo anti-PCSK9 individual con un chip biosensor CM5 de investigación mediante acoplamiento amino a niveles que daban una respuesta de unión de analitos máxima (Rmax) de no más de 200 unidades de resonancia (RU). La concentración de la proteína PCSK9 se varió en intervalos de 2 veces (el analito) y se inyectó sobre la superficie del anticuerpo inmovilizado (a una velocidad de flujo de 100 μ l/min durante 1,5 minutos). Se utilizó tampón HBS-P nuevo (pH 7,4, Hepes 0,01 M, NaCl 0,15 M, 0,005 % de surfactante P-20, Biacore) complementado con 0,01 % BSA como tampón de unión. Se midieron las afinidades de unión de cada anticuerpo anti-PCSK9 en experimentos separados contra cada una de las proteínas PCSK9 humana, de ratón y de mono cynomolgus a pH 7,4 (las concentraciones utilizadas fueron 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 y 0 nM).

Además, también se midieron las afinidades de unión del anticuerpo a la PCSK9 humana a pH 6,0 con el tampón HBS-P pH 6,0 (pH 6,0, Hepes 0,01 M, NaCl 0,15 M, 0,005 % de surfactante P-20, Biacore) complementado con 0,01 % de BSA. La señal de unión obtenida fue proporcional a la PCSK9 libre en solución. Se obtuvo la constante de equilibrio de disociación (K_D) a partir del análisis de regresión no lineal de las curvas de competencia

utilizando un modelo de unión homogéneo en un sitio de curva doble (software KinExA®, Sapidyne Instruments Inc., Boise, ID) (n=1 para las corridas de 6,0 pH). De manera interesante, los anticuerpos parecen mostrar una afinidad de unión más fuerte al pH más bajo (en donde la Kd fue 12,5, 7,3 y 29 pM para 31H4, 21B12 y 16F12 respectivamente).

5 Se determinaron los parámetros cinéticos de unión de los anticuerpos incluida la k_a (constante de velocidad de asociación), k_d (constante de velocidad de disociación) y K_D (constante de equilibrio de disociación) utilizando el programa de computación BIA evaluation 3.1 (BIAcore, Inc. Piscataway, NJ). Las constantes de velocidad de disociación más bajas indican mayor afinidad del anticuerpo por PCSK9. Los valores de K_D determinados mediante el
10 análisis de afinidad BIAcore® se presentan en la tabla 7.1, que se muestra a continuación.

TABLA 7.1

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

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

TABLA 7.2

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

Mediciones de afinidad KinExA®

Se realizó un análisis de afinidad KinExA® (Sapidyne Instruments, Inc., Boise, ID) de

16F12 y 31H4 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se recubrió previamente Reacti-Gel™ (6x) (Pierce) con una de las proteínas PCSK9 humana, cyno marcada con V5 o de ratón marcada con His y se bloqueó con BSA. Se incubaron 10 o 100 pM de anticuerpo 31H4 y una de las proteínas PCSK9 con varias concentraciones (0,1 pM – 25 nM) de proteínas PCSK9 a temperatura ambiente durante 8 horas antes de pasarse por las esferas recubiertas con PCSK9. Se cuantificó la cantidad de 31H4 unida a las esferas mediante anticuerpo IgG antihumano de cabra (H+L) etiquetado con fluorescencia (Cy5) (Jackson Immuno Research). La señal de unión es proporcional a la concentración de 31H4 libre en equilibrio de unión. Se obtuvo la constante de equilibrio de disociación (K_D) a partir de la regresión no lineal de los dos conjuntos de curvas de competencia utilizando un modelo de unión homogéneo en un sitio. Se utilizó el software KinExA® Pro en el análisis. Las curvas de unión generadas en este análisis se presentan como las figuras 4A-4F.

Los anticuerpos 16F12 y 31H4 presentaron una afinidad similar a PCSK9 humana y cyno, pero una afinidad aproximadamente 10-250 veces inferior que PCSK9 de ratón. De los dos anticuerpos evaluados utilizando el sistema KinExA®, el anticuerpo 31H4 mostró mayor afinidad por PCSK9 humana y cyno con 3 y 2 pM K_D , respectivamente. 16F12 mostró una afinidad algo más débil a 15 pM K_D hacia PCSK9 humana y 16 pM K_D hacia PCSK9 cyno.

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

20

TABLA 8.1

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

Además, se realizó un SDS PAGE para verificar la calidad y la cantidad de las muestras y se muestra en la figura 5A. cPCSK9 se mostró aproximadamente un 50 % menos sobre el gel y también a partir de la concentración de unión activa calculada del ensayo KinExA®. Por lo tanto, se ajustó la K_D de los mAb para cPCSK9 como el 50 % del cPCSK9 activo en el presente.

Se utilizó un ensayo de unión de equilibrio de solución BIAcore para medir los valores de K_d para ABP 21B12. 21B12.1 mostró poca señal utilizando el ensayo KinExA, por lo tanto, se aplicó el ensayo de equilibrio de solución biacore. Como no se observó una unión significativa en la unión de los anticuerpos a la superficie de PCSK9 inmovilizada, se inmovilizó el anticuerpo 21B12 en la célula de flujo 4 de un chip CM5 utilizando acoplamiento amino con densidad de aproximadamente 7000 RU. Se utilizó la célula de flujo 3 como control de fondo.

Se mezclaron 0,3, 1 y 3 nM de PCSK9 humana o PCSK9 cyno con diluciones seriadas de muestras del anticuerpo 21B12.1 (que oscilan entre 0,001 ~ 25 nM) en PBS más 0,1 mg/ml BSA, 0,005 % de P20. La unión de PCSK9 libre en las soluciones mezcladas se midió mediante la inyección sobre la superficie del anticuerpo 21B12.1. Se determinó el 100 % de señal de unión de PCSK9 sobre la superficie de 21B12.1 en ausencia de mAb en la solución. La disminución en la respuesta de unión a PCSK9 con concentraciones crecientes de mAb indicó la unión de PCSK9 con mAb en solución, que bloqueó la unión de PCSK9 con la superficie del peptidocuerpo inmovilizada. Para graficar la señal de unión de PCSK9 contra las concentraciones de mAb, se calculó K_D a partir de tres conjuntos de curvas (0,3, 1 y 3 nM concentración de PCSK9 fija) utilizando un modelo de unión homogénea en un sitio en el software KinExA Pro™. Aunque cPCSK9 tenía menor concentración de proteínas según el ensayo KinExA y SDS-gel, su concentración no se ajustó debido a que la concentración de cPCSK9 no se utilizó para calcular el K_D . Los resultados se muestran en la tabla 8.2 a continuación y en las figuras 5B-5D. La figura 5B ilustra los resultados del ensayo de equilibrio de solución a tres concentraciones de hPCSK9 diferentes para hPCSK9. La figura 5C ilustra un conjunto de resultados similar para mPCSK9. La figura 5D ilustra los resultados a partir del ensayo de captura biacore anterior.

TABLA 8.2

Muestra	hPCSK9		cPCSK		mPCSK	
	K_D (pM)	95 % CI	K_D (pM)	95 % CI	K_D (pM)	95 % CI
21B12.1	15	9~23	11	7~16	17000	-

EJEMPLO 9

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

Este ejemplo proporciona los valores de IC50 para dos de los anticuerpos para bloquear la capacidad de PCSK9 D374Y de unirse a LDLR. Se recubrieron placas de 384 pocillos transparentes (Costar) con 2 microgramos/ml de anticuerpo del receptor anti-LDL de cabra (R&D Systems) diluido en tampón A (100 mM de cacodilato de sodio, pH 7,4). Se lavaron completamente las placas con tampón A y después se bloquearon durante 2 horas con tampón B (1 % de leche en tampón A). Después del lavado, se incubaron las placas durante 1,5 horas con 0,4 microgramos/ml de receptor de LDL (R&D Systems) diluido en tampón C (tampón B complementado con CaCl2 10 mM). Simultáneamente a esta incubación, se incubaron 20 ng/ml de D374Y PCSK9 biotinilado con diversas concentraciones del anticuerpo IgG2 31H4, IgG4 31H4, IgG2 21B12 o IgG4 21B12, que se diluyó en tampón A o tampón A solo (control). Se lavaron las placas que contenían el receptor de LDL, se transfirió la mezcla de D374Y PCSK9 biotinilado/anticuerpo a las placas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se

detectó la unión del D374Y biotinilado al receptor de LDL mediante la incubación con estreptavidina-HRP (Biosource) a 500 ng/ml en tampón C seguido de sustrato TMB (KPL). Se desactivó la señal con HCl 1N y se leyó la absorbancia a 450 nm.

5 Los resultados de este estudio de unión se muestran en las figuras 6A-6D. En resumen, se determinaron los valores de IC₅₀ para cada anticuerpo y fueron 199 pM para IgG2 31H4 (figura 6A), 156 pM para IgG4 31H4 (figura 6B), 170 pM para IgG2 21B12 (figura 6C) y 169 pM para IgG4 21B12 (figura 6D).

Los anticuerpos también bloquearon la unión de PCSK9 natural con el LDLR en este ensayo.

10

EJEMPLO 10

Ensayo de absorción de LDL celular

Este ejemplo demuestra la capacidad de diversas proteínas de unión a antígenos de reducir la absorción de LDL por las células. Se sembraron células HepG2 humanas en placas de 96 pocillos negras, de fondo transparente (Costar) a una concentración de 5x10⁵ células por pocillo en medio DMEM (Mediatech, Inc) complementado con 10 % de FBS y se incubaron a 15 37 °C (5 % CO₂) durante la noche. Para formar el complejo de PCSK9 y anticuerpo, se incubaron 2 µg/ml de PCSK9 humano D374Y con diversas concentraciones de anticuerpo diluido en tampón de absorción (DMEM con 1 % de FBS) o tampón de absorción solo (control) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las células con PBS, se transfirió la 20 mezcla de PCSK9 D374Y/anticuerpo a las células, seguido de LDL-BODIPY (Invitrogen) diluido en tampón de absorción a una concentración final de 6 µg/ml. Después de la incubación durante 3 horas a 37 °C (5 % CO₂), se lavaron las células completamente con PBS y se detectó la señal de fluorescencia celular mediante Safire™ (TECAN) a 480-520 nm (excitación) y 520-600 nm (emisión).

25

Los resultados del ensayo de absorción celular se muestran en las figuras 7A-7D. En resumen, se determinaron los valores de IC₅₀ para cada anticuerpo y fueron 16,7 nM para IgG2 31H4 (figura 7A), 13,3 nM para IgG4 31H4 (figura 7B), 13,3 nM para IgG2 21B12 (figura 7C) y 18 nM para IgG4 21B12 (figura 7D). Estos resultados demuestran que las proteínas de unión a antígenos aplicadas pueden reducir el efecto de PCSK9 (D374Y) para bloquear la absorción de 30 LDL por las células. Los anticuerpos también bloquearon el efecto de PCSK9 natural en este ensayo.

EJEMPLO 11

Efecto reductor del colesterol en suero del anticuerpo 31H4 en un estudio de 6 días
Para evaluar la disminución del colesterol total en suero (TC) en ratones naturales

(WT) mediante terapia de anticuerpos contra la proteína PCSK9, se realizó el siguiente procedimiento.

Se alimentaron ratones WT machos (cepa C57BL/6, de 9-10 semanas, 17-27 g) obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) con un alimento normal (Harland-Teklad, dieta 2918) durante el experimento. Los ratones recibieron el anticuerpo 31H4 anti-PCSK9 (2 mg/ml en PBS) o IgG de control (2 mg/ml en PBS) en un nivel de 10 mg/kg a través de la vena de la cola del ratón en T=0. También se apartaron ratones sin tratamiento como el grupo de control sin tratamiento. Los grupos de dosificación y el momento del sacrificio se muestran en la tabla 9.

10

TABLA 9

Grupo	Tratamiento	Momento después de la dosificación	Número
1	IgG	8 h	7
2	31H4	8 h	7
3	IgG	24 h	7
4	31H4	24 h	7
5	IgG	72 h	7
6	31H4	72 h	7
7	IgG	144 h	7
8	31H4	144 h	7
9	Sin tratamiento	n/a	7

Se sacrificaron los ratones con asfixia por CO2 en los momentos predeterminados que se muestran en la tabla 9. Se recolectó sangre a través de la vena cava en tubos Eppendorf y se dejó coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se centrifugaron las muestras en una centrifuga de mesa a 12.000 xg durante 10 minutos para separar el suero. Se midieron el colesterol total en suero y el HDL-C utilizando un analizador clínico Hitachi 912 y los kit de TC y HDL-C Roche/Hitachi.

15

Los resultados del experimento se muestran en las figuras 8A-8D. En resumen, los ratones que recibieron el anticuerpo 31H4 presentaron niveles de colesterol en suero disminuidos durante el transcurso del experimento (figura 8A y figura 8B). Además, se observa que los ratones también presentaron niveles de HDL disminuidos (figura 8C y figura 8D). Para la figura 8A y 8C, el cambio porcentual es con relación a la IgG de control en el mismo momento (*P<0,01, # P<0,05). Para la figura 8B y 8D, el cambio porcentual es con relación a los niveles de colesterol total en suero y de HDL medidos en animales sin tratamiento en t=0 h (*P<0,01, # P<0,05).

20

25

Con respecto a la disminución de los niveles de HDL, cabe destacar que el entendido en la técnica apreciará que la disminución en el HDL en los ratones no indica que se producirá

una disminución del HDL en los seres humanos y esto solo refleja que el nivel de colesterol en suero en el organismo ha disminuido. Cabe destacar que los ratones transportan la mayoría del colesterol en suero en partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) lo cual difiere con los seres humanos, que transportan la mayor parte del colesterol en suero en partículas de LDL. En los ratones, la medición del colesterol total en suero se asemeja mucho al nivel de HDL-C en suero. El HDL de ratón contiene apolipoproteína E (apoE), que es un ligando para el receptor de LDL (LDLR) y que permite su eliminación mediante el LDLR. Por lo tanto, analizar el HDL es un indicador adecuado para el presente ejemplo en los ratones (con el sobreentendido de que para los seres humanos no se espera una disminución del HDL). Por ejemplo, por el contrario, el HDL humano no contiene apoE y no es un ligando para el LDLR. Como los anticuerpos PCSK9 aumentan la expresión de LDLR en los ratones, el hígado puede eliminar más HDL y, por lo tanto, disminuye los niveles de HDL-C en suero.

EJEMPLO 12

Efecto del anticuerpo 31H4 sobre el nivel de LDLR en un estudio de 6 días

El presente ejemplo demuestra que una proteína de unión a antígeno, con el tiempo, modifica el nivel de LDLR en un sujeto, como se predijo. Se realizó un análisis Western blot para determinar el efecto del anticuerpo 31H4 sobre los niveles de LDLR. Se homogenizaron 50-100 mg de tejido hepático obtenido a partir de los ratones sacrificados descritos en el ejemplo 13 en 0,3 ml de tampón RIPA (Santa Cruz Biotechnology Inc.) que contenía inhibidor de proteasa completo (Roche). Se incubó el homogenato en hielo durante 30 minutos y se centrifugó para sedimentar los residuos celulares. Se midió la concentración de proteínas en el sobrenadante utilizando reactivos de ensayo de proteínas BioRad (BioRad laboratories). Se desnaturalizaron 100 µg de proteína a 70 °C durante 10 minutos y se separaron en gel SDS Bis-Tris gradiente 4-12 % (Invitrogen). Se transfirieron las proteínas a una membrana PVDF 0,45 µm (Invitrogen) y se bloquearon en tampón de lavado (Tris 50 mM PH 7,5, NaCL 150 mM, CaCl₂ 2 mM y 0,05 % Tween 20) que contenía 5 % de leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente. Se sondeó el análisis con anticuerpo LDLR anti ratón de cabra (R&D system) 1: 2000 o actina anti-β (sigma) 1: 2000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó brevemente el análisis y se incubó con IgG-HRP anticabra de bovino (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 1: 2000 o IgG-HRP anti ratón de cabra (Upstate) 1: 2000. Después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, se lavó completamente el análisis y se detectaron bandas inmunorreactivas utilizando el kit ECL plus (Amersham biosciences). El análisis Western blot mostró un aumento en los niveles de proteína LDLR en presencia del anticuerpo 31H4, como se ilustra en la figura 9.

EJEMPLO 13

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

Para evaluar la disminución del colesterol total en suero (TC) en ratones naturales (WT) mediante terapia de anticuerpos contra la proteína PCSK9 en un estudio de 13 días, se realizó el siguiente procedimiento.

Se alimentaron ratones WT machos (cepa C57BL/6, de 9-10 semanas, 17-27 g) obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) con un alimento normal (Harland-Teklad, dieta 2918) durante el experimento. Los ratones recibieron el anticuerpo 31H4 anti-PCSK9 (2 mg/ml en PBS) o IgG de control (2 mg/ml en PBS) en un nivel de 10 mg/kg a través de la vena de la cola del ratón en T=0. También se apartaron ratones sin tratamiento como el grupo de control sin tratamiento.

Los grupos de dosificación y el momento del sacrificio se muestran en la tabla 10. Se sacrificaron los animales, se les extrajeron los hígados y se prepararon como en el ejemplo 13.

TABLA 10

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

Cuando el experimento de 6 días se extendió a un estudio de 13 días, el mismo efecto reductor del colesterol en suero observado en el estudio de 6 días también se observó en el estudio de 13 días. Más específicamente, los animales con dosis de 10 mg/kg demostraron una disminución del 31 % en los niveles de colesterol en suero el día 3, que gradualmente volvió a los niveles previos a la dosificación para el día 13. La figura 10A ilustra los resultados de este experimento. La figura 10C ilustra los resultados de la repetición del procedimiento anterior con

la dosis de 10 mg/kg de 31H4 y con otro anticuerpo, 16F12, también con 10 mg/kg. Los grupos de dosificación y el momento del sacrificio se muestran en la tabla 11.

TABLA 11

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

5 Como se muestra en la figura 10C, 16F12 y 31H4 provocaron disminuciones significativas y considerables en el colesterol total en suero después de una única dosis y proporcionaron beneficios durante más de una semana (10 días o más). Los resultados del estudio de 13 días repetido fueron congruentes con los resultados del primer estudio de 13 días, con una disminución en los niveles del colesterol en suero del 26 % el día 3. Para la figura 10A y 10B, el cambio porcentual es con relación a la IgG de control en el mismo momento (*P<0,01).
10 Para la figura 10C, el cambio porcentual es con relación a la IgG de control en el mismo momento (*P<0,05).

EJEMPLO 14

Efecto del anticuerpo 31H4 sobre el nivel de HDL en un estudio de 13 días

15 También se analizaron los niveles de HDL para los animales del ejemplo 15. Los niveles de HDL disminuyeron en los ratones. Más específicamente, los animales con dosis de 10 mg/kg demostraron una disminución del 33 % en los niveles de HDL el día 3, que gradualmente volvió a los niveles previos a la dosificación para el día 13. La figura 10B ilustra los resultados del experimento. Hubo una disminución en los niveles de HDL del 34 % el día 3.
20 La figura 10B ilustra los resultados del experimento de 13 días repetido.

Como apreciará el entendido en la técnica, mientras los anticuerpos bajarán el HDL en los ratones, no se espera que esto ocurra en los seres humanos debido a las diferencias entre el HDL en los humanos y en otros organismos (como el ratón). Por lo tanto, la disminución del HDL en los ratones no indica una disminución en el HDL humano.

5

EJEMPLO 15

La administración repetida de anticuerpos produce beneficios continuos de los péptidos de unión a antígenos

10

Para verificar que los resultados obtenidos en los ejemplos anteriores se pueden prolongar para obtener mayores beneficios con dosis adicionales, se repitieron los experimentos de los ejemplos 15 y 16 con el plan de dosificación ilustrado en la figura 11A. Los resultados se muestran en la figura 11B. Como se puede ver en la gráfica de la figura 11B, aunque ambos conjuntos de ratones presentaron una disminución importante en el colesterol total en suero porque todos los ratones recibieron una inyección inicial de la proteína de unión a antígeno 31H4, los ratones que recibieron inyecciones adicionales de ABP 31H4 presentaron una reducción continua en el colesterol total en suero, mientras que los ratones que solo recibieron la inyección del control eventualmente presentaron un aumento en el colesterol total en suero. Para la figura 11, el cambio porcentual es con relación a los animales sin tratamiento en t=0 horas (*P<0,01, **P<0,001).

15

20

Los resultados de este ejemplo demuestran que, a diferencia de otros métodos de tratamiento del colesterol, en los cuales las aplicaciones repetidas producen una reducción en la eficacia debido a los ajustes biológicos en el sujeto, el presente enfoque no parece sufrir de este problema durante el periodo de tiempo examinado. Por otra parte, esto sugiere que el retorno de los niveles de colesterol total en suero o de colesterol HDL a los valores de referencia observado en los ejemplos anteriores no es debido a determinada resistencia al tratamiento que está desarrollando el sujeto, sino más bien a la disminución de la disponibilidad de anticuerpos en el sujeto.

25

EJEMPLO 16

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

30

A un paciente humano que presenta un trastorno relacionado con el colesterol (en el cual una reducción del colesterol (como el colesterol en suero) puede ser beneficiosa) se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo PCSK9, 31H4 (o, por ejemplo, 21B12). En momentos periódicos durante el tratamiento, se monitoriza al paciente para determinar si los síntomas del trastorno han desaparecido. Después del tratamiento, se

descubre que los pacientes que se sometieron a tratamiento con el anticuerpo PCSK9 disminuyeron el nivel de colesterol en suero, en comparación con los sujetos no tratados.

EJEMPLO 17

Usos de anticuerpos PCSK9 para el tratamiento de la hipercolesterolemia

5 A un paciente humano que presenta síntomas de hipercolesterolemia, se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo PCSK9, como 31H4 (o, por ejemplo, 21B12). En momentos periódicos durante el tratamiento, se monitoriza al paciente humano para determinar si el nivel de colesterol en suero ha disminuido. Después del tratamiento, se
10 descubre que el paciente que estaba recibiendo el tratamiento con los anticuerpos PCSK9 redujo el nivel de colesterol en suero, en comparación con los sujetos con artritis que no recibieron el tratamiento.

EJEMPLO 18

Usos de anticuerpos PCSK9 para la prevención de la enfermedad cardíaca coronaria y/o eventos cardiovasculares recurrentes

15 Se identifica un paciente humano con riesgo de desarrollar enfermedad cardíaca coronaria. Se le administra al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo PCSK9, como 31H4 (o, por ejemplo, 21B12), solo, en forma conjunta o secuencial con una estatina, p. ej., simvastatina. En momentos periódicos durante el tratamiento, se monitoriza al
20 paciente humano para determinar si cambia el nivel de colesterol total en suero del paciente. Durante el tratamiento preventivo, se descubre que el paciente que recibió el tratamiento con los anticuerpos PCSK9 redujo el colesterol en suero y redujo así el riesgo de sufrir enfermedades cardíacas coronarias o eventos cardiovasculares recurrentes en comparación con los pacientes que no recibieron el tratamiento.

EJEMPLO 19

25 Uso de la proteína de unión a antígenos PCSK9 para la prevención de la hipercolesterolemia

 Se identifica un paciente humano que presenta riesgo de desarrollar hipercolesterolemia a través del análisis de los antecedentes familiares y/o del estilo de vida y/o de los niveles de colesterol actuales. Se le administra regularmente al sujeto (p. ej., una vez por
30 semana) una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo PCSK9, 31H4 (o, por ejemplo, 21B12). En momentos periódicos durante el tratamiento, se monitoriza al paciente para determinar si el nivel de colesterol en suero ha disminuido. Después del tratamiento, se descubre que los sujetos que se sometieron a tratamiento preventivo con el anticuerpo PCSK9 disminuyeron el nivel de colesterol en suero, en comparación con los sujetos no tratados.

EJEMPLO 20

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

5 Este estudio fue un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo, ascendente, de dosis única para evaluar la seguridad, la tolerabilidad, PK, farmacodinámica (PD) (LDL-C) e inmunogenicidad de un anticuerpo anti-PCSK9 humano (anticuerpo monoclonal 21B12) en sujetos sanos. Los sujetos fueron aleatorizados en una proporción de 3: 1 (21B12: placebo; 8 sujetos por cohorte de dosis para un total de 56 sujetos en 7 cohortes) para recibir 10 21B12 en dosis de 7, 21, 70, 210 o 420 mg SC o el placebo correspondiente; o 21B12 en dosis de 21 o 420 mg IV el placebo correspondiente.

Se aleatorizaron cincuenta y seis sujetos que recibieron el producto en investigación (42 21B12, 14 placebo); 40 sujetos (30 21B12, 10 placebo) recibieron el producto en investigación por vía SC de administración y 16 sujetos (12 21B12, 4 placebo) recibieron el 15 producto en investigación por vía IV. Cincuenta y tres de los 56 sujetos (95 %), que recibieron el producto en investigación, completaron el estudio. Tres sujetos que recibieron 21B12 retiraron el consentimiento absoluto y no completaron el estudio.

La población del estudio estaba compuesta principalmente por hombres (54 [96 %]) y el promedio de edad fue de 31,2 (intervalo: 20 a 45) años. El ochenta y seis por ciento de los 20 sujetos eran blancos, seguido del 9 % hispanos/latinos, el 4 % negros y el 1 % otros. Los valores de LDL-C de referencia promedio fueron similares entre los grupos de tratamiento y oscilaron entre 113 y 143 mg/dL.

En este estudio, el 21B12 redujo el LDL-C en un promedio del 55 % al 60 % en dosis únicas ≥ 70 mg SC y la duración del efecto dependió de la dosis. El punto más bajo del LDL-C 25 se observó a las 2 semanas de la dosificación. Se observó una supresión completa de PCSK9 con dosis únicas ≥ 70 mg SC, que se correlacionó bien con los efectos observados en el LDL-C circulante.

Los análisis PK demostraron que 21B12 presentó eliminación no lineal (dependiente de la concentración). El t_{max} promedio osciló entre 4 y 6 días. Como se esperaba, la concentración 30 observada máxima media (C_{max}) más alta y el área bajo la curva de concentración-tiempo desde el tiempo 0 al infinito (AUC_{0-inf}) se produjo en el grupo de 420 mg IV y fueron 139 $\mu\text{g/mL}$ y 1550 $\text{día}\cdot\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Se informaron eventos adversos provocados por el tratamiento para 29 de los 42 sujetos (69 %) que recibieron 21B12 en cualquier dosis y para 10 de los 14 sujetos (71 %) que

recibieron placebo. No hubo relación evidente entre la incidencia de los eventos adversos en los sujetos y la dosis de 21B12 o entre la incidencia de los eventos adversos en los sujetos y la vía de administración del 21B12 (SC contra IV).

5 Ningún evento adverso se informó como grave y ningún sujeto abandonó el estudio debido a los eventos adversos. No hubo muertes en el estudio.

Se informaron eventos adversos relacionados con el tratamiento para 18 de los 42 sujetos (43%) que recibieron 21B12 y para 10 de los 14 sujetos (71 %) que recibieron placebo. No hubo relación evidente entre la incidencia de los eventos adversos relacionados con el tratamiento en los sujetos y la dosis de 21B12 o entre la incidencia de los eventos adversos
10 relacionados con el tratamiento en los sujetos y la vía de administración del 21B12 (SC contra IV).

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

En este estudio, 21B12 parece haber sido bien tolerado con dosis únicas SC e IV de
15 hasta 420 mg.

Se evaluaron muestras de suero de los sujetos inscriptos en este estudio en cuanto a la presencia (valor de referencia) o el desarrollo (post-tratamiento) de anticuerpos anti-21B12. Las muestras de los 42 sujetos que recibieron 21B12 fueron negativas para los anticuerpos anti-21B12.

20

EJEMPLO 21

Un estudio de fase 1, aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo, ascendente, de dosis múltiple para evaluar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética y farmacodinámica de un anticuerpo Anti-PCSK9 humano en sujetos con hiperlipidemia con dosis estables de una
estatina

25

Este estudio es un estudio de fase 1b, aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo, ascendente, de dosis múltiple que utiliza un anticuerpo anti-PCSK9 humano (anticuerpo monoclonal 21B12) en sujetos hiperlipidémicos (p. ej., hipercolesterolémicos) que actualmente están tomando dosis estables de una estatina. El estudio tenía siete cohortes. Los objetivos para todos los cohortes incluían la caracterización de la seguridad, tolerabilidad e
30 inmunogenicidad de 21B12 y la caracterización de PK y PD (LDL-C y PCSK9). Los cohortes de 1 a 5 del estudio representan la porción de aumento de la dosis de 21B12 en sujetos hipercolesterolémicos con dosis estables bajas a moderadas de una estatina. Los sujetos en los cohortes de 1 a 5 (n = 8 por cohorte) con LDL-C (70-200 mg/dL) con rosuvastatina <40 mg, atorvastatina <80 mg o simvastatina 20–80 mg diarias estables durante ≥1 mes fueron

aleatorizados en una proporción de 3: 1 para recibir 1 de 5 dosis SC de 21B12 (14 o 35 mg QW 6 veces; o 140 mg o 280 mg Q2W 3 veces; o 420 mg Q4W 2 veces) o el placebo correspondiente, respectivamente. El cohorte 6 se realizó en sujetos hipercolesterolémicos con dosis altas de una estatina (atorvastatina 80 mg o rosuvastatina 40 mg). Los sujetos en este cohorte (n=12) estaban tomando rosuvastatina 40 mg o atorvastatina 80 mg y fueron aleatorizados en una proporción de 3: 1 para recibir 21B12 (140 mg SC Q2W 3 veces) o el placebo correspondiente, respectivamente. El cohorte 7 se realizó en sujetos con hipercolesterolemia familiar heterocigótica (identificados utilizando los criterios de la OMS); los sujetos en este cohorte (n = 6) fueron aleatorizados en una proporción de 2: 1 para recibir 21B12 (140 mg SC Q2W 3 veces) o el placebo correspondiente, respectivamente. Para ser claros, el cohorte 1 recibió dosis SC de 14 mg de 21B12 una vez por semana, 6 veces. El cohorte 2 recibió dosis SC de 35 mg de 21B12 una vez por semana, 6 veces. El cohorte 3 recibió dosis SC de 140 mg de 21B12 una vez cada dos semanas, 3 veces. El cohorte 4 recibió dosis SC de 280 mg de 21B12 una vez cada dos semanas, 3 veces. El cohorte 5 recibió dosis SC de 420 mg de 21B12 cada 4 semanas, 2 veces.

Se obtuvieron resultados preliminares de 40 sujetos que se habían inscripto y habían sido aleatorizados para 21B12 o placebo. De estos 40 sujetos, 28 sujetos habían recibido ≥ 1 dosis del producto en investigación (21B12 o placebo) y por lo tanto representaron el conjunto de análisis de seguridad preliminar (cegado al tratamiento). Los datos de seguridad cegados preliminares estaban disponibles para estos 28 sujetos, todos de los cohortes de 1 a 4. No se informaron muertes, eventos adversos graves o retiros anticipados debido a eventos adversos. En general, se informó al menos 1 evento adverso para 15 de los 28 sujetos (54 %) que habían recibido ≥ 1 dosis del producto en investigación. La mayoría de los eventos adversos (cegados al tratamiento) se informaron para sujetos únicos, excepto la fatiga, la artralgia, la constipación y la infección respiratoria superior viral, los cuales se informaron para 2 de los 28 sujetos (7 %).

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

En los resultados finales, se aleatorizaron sujetos (N=51) en los cohortes 1-6 para recibir 21B12 (N=39) o placebo (N=12); 26 sujetos (51 %) eran hombres; la edad promedio (SD)

fue 58 (7) años. No se informaron muertes ni eventos adversos graves (AE) y ningún sujeto abandonó el estudio debido a un AE. No se detectaron anticuerpos neutralizantes para 21B12.

Los sujetos en los cohortes 1-5 con dosis bajas a moderadas de estatinas presentaron reducciones del LDL-C promedio de hasta el 81 % contra el placebo en la reducción máxima y 75 % contra el placebo al final del intervalo de dosificación (es decir, en la semana 6) después de 3 dosis SC de 21B12 cada dos semanas y 66 % al final del intervalo de dosificación (es decir, en la semana 8) después de 2 dosis SC cada 4 semanas. Los sujetos en los cohortes 1-5 con dosis bajas a moderadas de estatinas presentaron reducciones de LDL-C máximas de hasta el 81 % contra el placebo en la reducción máxima y el 75 % contra el placebo al final del intervalo de dosificación (figura 14). La magnitud y la duración del efecto fueron dependientes de las dosis. Con dosis más altas, no se pudo detectar PCSK9 en plasma. Del mismo modo, al final del intervalo de dosificación después de 3 dosis cada dos semanas, los sujetos con dosis altas de estatinas (cohorte 6) presentaron una reducción promedio en el LDL-C del 63 % contra el placebo y una reducción máxima en el LDL-C del 73 % contra el placebo (figura 15).

Estos datos muestran que las dosis SC repetidas de 21B12 durante 6 semanas redujeron el LDL-C circulante en hasta el 81 % contra el placebo, dependiendo del régimen de dosificación, en sujetos con dosis bajas a moderadas o altas de estatinas, sin AE graves. El efecto reductor del LDL-C de 21B12 fue semejante entre los grupos de dosis con estatina de dosis alta y estatina baja a moderada.

Los sujetos en los cohortes 1-5 con dosis bajas a moderadas de estatinas presentaron una reducción promedio de los niveles de PCSK9 de hasta el 94 % contra el placebo al final del intervalo de dosificación, no se muestran los datos. Los sujetos en los cohortes 1-5 con dosis bajas a moderadas de estatinas presentaron reducciones de ApoB promedio de hasta el 54 % contra el placebo al final del intervalo de dosificación y reducciones máximas que oscilaron entre el 48 % (35 mg QW) y el 59 % (140 mg y 280 mg Q2W y 420 mg Q4W) durante el estudio ($p < 0,001$)(figura 16). Además, los sujetos en los cohortes 1-6 con dosis bajas a moderadas y altas de estatinas presentaron reducciones de Lp(a) promedio de hasta el 43 % contra el placebo al final del intervalo de dosificación (figura 17).

Los sujetos en el cohorte 7 con heFH presentaron una reducción promedio en el LDL-C del 65 % contra el placebo al final del intervalo de dosificación (es decir, en la semana 6, 2 semanas después de la tercera dosis SC cada dos semanas de 21B12) y una reducción de LDL-C máxima del 70 % contra el placebo (figura 18). Las reducciones de LDL-C durante el intervalo de dosificación fueron semejantes a las observadas en los sujetos sin heFH. Después del tratamiento con 21B12, no se pudo detectar PCSK9 circulante en los sujetos con heFH.

Los sujetos en el cohorte 7 con heFH presentaron una reducción promedio en los valores de PCSK9 en suero del 78 % contra el placebo al final del intervalo de dosificación (es decir, en la semana 6, 2 semanas después de la tercera dosis SC cada dos semanas de 21B12)(figura 19). Los sujetos en el cohorte 7 con heFH presentaron una reducción promedio en el colesterol total de hasta el 42 % contra el placebo al final del intervalo de dosificación (es decir, en la semana 6, 2 semanas después de la tercera dosis SC cada dos semanas de 21B12) y una reducción del colesterol total máxima del 47 % contra el placebo (figura 20). Los sujetos en el cohorte 7 con heFH presentaron una reducción promedio en el colesterol no HDL del 61 % contra el placebo al final del intervalo de dosificación (es decir, en la semana 6, 2 semanas después de la tercera dosis SC cada dos semanas de 21B12) y una reducción del colesterol no HDL máxima del 67 % contra el placebo (figura 21). Los sujetos en el cohorte 7 con heFH presentaron una reducción promedio en los niveles de ApoB de hasta el 47 % contra el placebo al final del intervalo de dosificación (es decir, en la semana 6, 2 semanas después de la tercera dosis SC cada dos semanas de 21B12) y una reducción de ApoB máxima del 57 % contra el placebo (figura 22). Los sujetos en el cohorte 7 con heFH presentaron una reducción promedio en la lipoproteína a (Lp(a)) del 50 % contra el placebo al final del intervalo de dosificación (es decir, en la semana 6, 2 semanas después de la tercera dosis SC cada dos semanas de 21B12)(figura 23).

En el cohorte 7, 21B12 disminuyó los niveles de PCSK9 no unido y bajó sustancialmente los niveles de LDL-C circulante en los sujetos con heFH e hiperlipidemia que estaban recibiendo terapia convencional. La dosis cada dos semanas evaluada proporcionó reducciones de LDL-C en los sujetos con heFH semejantes a las reducciones en los sujetos sin heFH. No se informaron AE graves.

EJEMPLO 22

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

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de 12 semanas del anticuerpo anti-PCSK9 humano (anticuerpo monoclonal 21B12) subcutáneo (SC) en comparación con el placebo, sobre el cambio porcentual con respecto al valor de referencia en el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) en sujetos con hipercolesterolemia familiar heterocigótica (HeFH).

Este estudio es un ensayo clínico doble ciego, aleatorizado, estratificado, controlado por placebo que evalúa la seguridad, la tolerabilidad y la eficacia del anticuerpo monoclonal

21B12 en sujetos que tienen diagnóstico de HeFH. Se planifica un total de 150 sujetos inscritos. Los sujetos que cumplan con todos los criterios de inclusión/exclusión serán aleatorizados con las mismas probabilidad en 3 grupos de tratamiento: anticuerpo monoclonal, 21B12 a 350 mg o 420 mg Q4W SC (una vez cada 4 semanas, subcutáneo) o placebo Q4W SC. La aleatorización se estratificará según el nivel de LDL-C de selección (< 130 mg/dL [3,4 mmol/L] contra ≥ 130 mg/dL) y el uso de ezetimiba en el inicio (sí contra no). La aleatorización debe realizarse dentro de 5 a 10 días de la evaluación del LDL-C de selección utilizada para determinar la elegibilidad. El anticuerpo monoclonal, 21B12 y el placebo estarán cegados. Las visitas del estudio son en las semanas 2, 4, 8 y 12. La administración final del anticuerpo monoclonal, 21B12, o del placebo es en la semana 8. La visita de final del estudio (EOS) y la última evaluación de los lípidos es en la semana 12.

Para este estudio son elegibles hombres y mujeres, $\geq 18 \leq 75$ años y con diagnóstico de hipercolesterolemia familiar heterocigótica según los criterios de diagnóstico del Simon Broome Register Group (SBRG). Para la inscripción, los sujetos deben estar tomando una estatina aprobada, con dosis estables para todos los fármacos reguladores de lípidos autorizados (p. ej., ezetimiba, resina secuestrante de ácidos biliares, estanoles o niacina aprobada regulatoriamente y comercializada (p. ej., Niaspan o Niacor)) durante al menos 4 semanas antes de la selección de LDL-C y que, a criterio del investigador, no requiera ajuste ascendente. El LDL-C en ayunas debe ser ≥ 100 mg/dL (2,6 mmol/L) y los triglicéridos en ayunas ≤ 400 mg/dL (4,5 mmol/L) según el laboratorio central en la selección.

Los datos preliminares (no se muestran) demostraron que los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de mínimos cuadrados (LS) en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 38,46 % al final del intervalo de dosificación y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 45,68 %. Los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en la Lp(a) con respecto al valor de referencia del 21,69 % al final del intervalo de dosificación y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en la Lp(a) con respecto al valor de referencia del 28,23 %. Los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron un aumento porcentual promedio de LS en el HDL-C con respecto al valor de referencia del 15,39 % al final del intervalo de dosificación y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el HDL-C con respecto al valor de referencia del 6,77 %. Los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el VLDL-C con respecto al valor de referencia del

17,16 % al final del intervalo de dosificación y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el VLDL-C con respecto al valor de referencia del 18,49 %. Los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en los triglicéridos con respecto al valor de referencia del 17,24 % al final del intervalo de dosificación y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en los triglicéridos con respecto al valor de referencia del 4,56 %. Los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el colesterol no HDL con respecto al valor de referencia del 36,16 % al final del intervalo de dosificación y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el colesterol no HDL con respecto al valor de referencia del 41,81 %. Por último, los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el colesterol total con respecto al valor de referencia del 24,82 % al final del intervalo de dosificación y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el colesterol total con respecto al valor de referencia del 29,45 % (los datos no se muestran).

La figura 24 es una gráfica que representa los datos de reducción de LDL-C para las siguientes dosis de 21B12: 70 mg, 105 mg y 140 mg (dosificación una vez cada dos semanas o Q2W) y 280 mg, 350 mg y 420 (dosificación una vez por mes o Q4W). (Estos datos son los datos globales de los estudios descritos en los ejemplos 22-25.) En resumen, los datos globales muestran que 140 mg Q2W provocan una reducción de aproximadamente el 60 % en el LDL-C con respecto al valor de referencia en la semana 12 y un mantenimiento sin problemas de la reducción del LDL-C. Además, estos datos muestran que los 420 mg Q4W provocan una reducción aproximada del 56 % en el LDL-C con respecto al valor de referencia en la semana 12 y menos rebote del LDL-C al final del intervalo de dosificación.

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

EJEMPLO 23

Un estudio aleatorizado para evaluar la tolerabilidad y la eficacia de un anticuerpo Anti-PCSK9 humano sobre el LDL-C comparado con la ezetimiba en pacientes con hipercolesterolemia que no pueden tolerar una dosis eficaz de un inhibidor de HMG-Co-A

reductasa

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de 12 semanas del anticuerpo anti-PCSK9 humano (anticuerpo monoclonal 21B12) subcutáneo (SC) en comparación con la ezetimiba, sobre el cambio porcentual con respecto al valor de referencia en el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) en pacientes con hipercolesterolemia que no pueden tolerar una dosis eficaz de un inhibidor de HMG-CoA reductasa.

Este estudio es un ensayo clínico aleatorizado, estratificado, con grupo paralelo para el anticuerpo anti-PCSK9 humano, el anticuerpo monoclonal, 21B12. Se planifica la inscripción de 150 sujetos. Los sujetos que cumplan con todos los criterios de inclusión/exclusión serán aleatorizados con las mismas probabilidad en 5 grupos de tratamiento: anticuerpo monoclonal, 21B12 a 280 mg, 350 mg o 420 mg Q4W SC (una vez cada 4 semanas, subcutáneo); ezetimiba a 10 mg por día (QD) oral (PO) con anticuerpo monoclonal, 21B12 a 420 mg Q4W SC; o ezetimiba 10 mg QD PO con placebo Q4W SC. La aleatorización se estratificará según el nivel de LDL-C de selección (< 130 mg/dL [$3,4$ mmol/L] contra ≥ 130 mg/dL) y el uso de estatina en el inicio (sí contra no). La aleatorización debe realizarse dentro de 5 a 10 días de la evaluación del LDL-C de selección utilizada para determinar la elegibilidad. El anticuerpo monoclonal, 21B12 y el placebo estarán cegados. La ezetimiba no estará cegada. Las visitas del estudio son en las semanas 2, 4, 8 y 12. La administración final del anticuerpo monoclonal, 21B12, o del placebo es en la semana 8. La visita de final del estudio y la última evaluación de los lípidos es en la semana 12.

Para este estudio son elegibles hombres y mujeres, $\geq 18 \leq 75$ años. El sujeto debe haber probado al menos 1 estatina y no puede haber sido capaz de tolerar ninguna dosis o un aumento en la dosis de estatina por encima del siguiente máximo semanal total debido a mialgia o miopatía: atorvastatina ≤ 70 mg, simvastatina ≤ 140 mg, pravastatina ≤ 140 mg, rosuvastatina ≤ 35 mg, lovastatina ≤ 140 mg, fluvastatina ≤ 280 mg. Para las estatinas no enumeradas, la dosis máxima semanal total no debe superar 7 veces el tamaño del comprimido más pequeño disponible. Los síntomas se deben haber resuelto con la interrupción o la reducción de la dosis de la estatina. Si está recibiendo terapia de estatina (que no supere la dosis máxima definida anteriormente), resina secuestrante de ácidos biliares y/o estanol, la dosis debe ser estable durante al menos 4 semanas antes de la evaluación de LDL-C. Si el sujeto está tomando ezetimiba al comienzo de la evaluación, se debe interrumpir la ezetimiba durante ≥ 4 semanas antes de la evaluación de LDL-C. Dependiendo de su categoría de riesgo (según las metas de tratamiento de ATP III de NCEP), los sujetos deben cumplir con los siguientes criterios de LDL-C en ayunas (según el laboratorio central) en la selección: $\geq$

100 mg/dL (2,6 mmol/L) para los sujetos con enfermedad cardíaca coronaria diagnosticada (CHD) o con un equivalente de riesgo de la CHD; ≥ 130 mg/dL (3,4 mmol/L) para los sujetos sin CHD diagnosticada o equivalente de riesgo y 2 o más factores de riesgo; ≥ 160 mg/dL (4,1 mmol/L) para los sujetos sin CHD diagnosticada o equivalente de riesgo y con 1 o sin factores de riesgo. Los triglicéridos en ayunas deben ser ≤ 400 mg/dL (4,5 mmol/L) según lo determine el análisis del laboratorio central en la selección.

Los datos preliminares (no se muestran) demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 38,79 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 40,01 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 50,63 %. Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en Lp(a) con respecto al valor de referencia del 27,38 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en Lp(a) con respecto al valor de referencia del 16,04 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en Lp(a) con respecto al valor de referencia del 23,84 %. Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 presentaron un aumento porcentual promedio de LS en el HDL-C con respecto al valor de referencia del 8,62 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron un aumento porcentual promedio de LS en el HDL-C con respecto al valor de referencia del 4,62 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron un aumento porcentual promedio de LS en el HDL-C con respecto al valor de referencia del 7,55 %. Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el VLDL-C con respecto al valor de referencia del 31,02 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el VLDL-C con respecto al valor de referencia del 38,14 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el VLDL-C con respecto al valor de referencia del 37,27 %. Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en los triglicéridos con respecto al valor de referencia del 15,35 % al

final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en los triglicéridos con respecto al valor de referencia del 19,22 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en los triglicéridos con respecto al valor de referencia del 19,55 %. Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el colesterol total con respecto al valor de referencia del 31,03 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el colesterol total con respecto al valor de referencia del 34,46 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el colesterol total con respecto al valor de referencia del 42,23 %. Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el no-HDL-C con respecto al valor de referencia del 39,92 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el no-HDL-C con respecto al valor de referencia del 42,86 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el no-HDL-C con respecto al valor de referencia del 53,49 %.

EJEMPLO 24

Un estudio aleatorizado, controlado por placebo y ezetimiba, con rango de dosis para evaluar la tolerabilidad y la eficacia de un anticuerpo Anti-PCSK9 humano sobre el LDL-C en pacientes con hipercolesterolemia con un puntaje de riesgo de Framingham de 10 años del 10 % o menos

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de 12 semanas del anticuerpo anti-PCSK9 humano (anticuerpo monoclonal 21B12) subcutáneo (SC) cada 2 semanas (Q2W) o cada 4 semanas (Q4W) en comparación con el placebo, sobre el cambio porcentual con respecto al valor de referencia en el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) cuando se utiliza como una monoterapia en sujetos hipercolesterolémicos con un puntaje de riesgo de Framingham de 10 años del 10 % o menos.

Este estudio fue un ensayo clínico aleatorizado, estratificado, controlado por placebo y ezetimiba, con grupo paralelo y con rango de dosis para el anticuerpo anti-PCSK9 humano, el anticuerpo monoclonal, 21B12 en el cual se inscribieron 411 sujetos. Los sujetos que cumplían con todos los criterios de inclusión/exclusión fueron aleatorizados con las mismas probabilidad en 9 grupos de tratamiento: 1 de 6 regímenes de dosis de anticuerpo monoclonal, 21B12

(70 mg, 105 mg o 140 mg Q2W SC o 280 mg, 350 mg o 420 mg Q4W SC (una vez cada 4 semanas, subcutáneo), placebo con administración SC Q2W o Q4W, o ezetimiba con administración diaria (QD) oral (PO). La aleatorización se estratificó según el nivel de LDL-C (<130 mg/dL [3,4 mmol/L] contra > 130 mg/dL). La aleatorización se realizó dentro de 5 a 10 días de la evaluación del LDL-C de selección utilizada para determinar la elegibilidad. Las visitas del estudio fueron cada 2 semanas, independientemente de que el sujeto recibiera tratamiento Q2W SC o Q4W o ezetimiba. Los grupos de dosis 3 Q2W del anticuerpo monoclonal 21B12 y el grupo de placebo 1 Q2W fueron cegados entre sí y los grupos de dosis 3 Q4W y el grupo de placebo 1 Q4W fueron cegados entre sí. La ezetimiba no fue cegada. La visita de final del estudio y el último cálculo de los lípidos fue en la semana 12 para los sujetos con el plan Q4W IP o con ezetimiba y en la semana 14 para los sujetos con el plan Q2W IP.

Para este estudio fueron elegibles hombres y mujeres, $\geq 18 \leq 75$ años. El LDL-C en ayunas fue ≥ 100 mg/dL (2,6 mmol/L) y < 190 mg/dL (4,9 mmol/L) y los triglicéridos en ayunas ≤ 400 mg/dL (4,5 mmol/L) según el laboratorio central en la selección. Los sujetos tuvieron un puntaje de riesgo de Framingham del Panel III de tratamiento de adultos del programa nacional para la educación sobre el colesterol (NCEP ATP III) del 10 % o menos.

El criterio de valoración primario fue el cambio porcentual con respecto al valor de referencia en el LDL-C en la semana 12. Los criterios de valoración secundarios incluyeron los cambios porcentuales en la apolipoproteína B (ApoB), lipoproteína (a) (Lp(a)) y en la proporción de colesterol total a lipoproteínas de alta densidad (HDL)-C. También se evaluaron la tolerabilidad y la seguridad.

Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 41,21 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 45,44 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 51,56 % (los datos no se muestran).

Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q4W) presentaron una reducción porcentual promedio en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 37,53 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 42,16 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio en el LDL-C con respecto al valor de

referencia del 47,52 % (los datos no se muestran).

Los datos finales demostraron que en la semana 12, los sujetos que recibieron 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de mínimos cuadrados (LS) en el LDL-C con respecto al valor de referencia de hasta el 51 % (tabla 12); el cambio porcentual con respecto al valor de referencia para la ezetimiba fue del 14 %. El cambio con respecto al valor de referencia para la semana 12 fue de hasta 72 mg/dL superior con 21B12 que con el placebo. Los sujetos que recibieron 21B12 presentaron reducciones en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 37 %-53 % superiores que con el placebo y del 37 % superiores que con ezetimiba. Las reducciones promedio con respecto al valor de referencia para ApoB (hasta el 44 %), Lp(a) (hasta el 29 %) y la proporción de colesterol total/HDL (hasta el 38 %) fueron superiores con 21B12 que con el placebo.

TABLA 12:

Cambio porcentual en la semana 12 con respecto al valor de referencia en LDL-C: 21B12 SC contra ezetimiba o placebo

	Q2W				Q4W				Ezetimiba QD (N=45)
	Placebo (N=45)	70 mg (N=45)	105 mg (N=46)	140 mg (N=45)	Placebo (N=45)	280 mg (N=45)	350 mg (N=45)	420 mg (N=45)	
Cambio porcentual promedio de mínimos cuadrados con respecto al valor de referencia (%)	-3,71	-40,98	-43,87	-50,93	4,54	-39,02	-43,20	-47,98	-14,26
Diferencia de tratamiento contra placebo (%)	-	-37,27*	-40,17*	-47,23*	-	-43,57*	-47,74*	-52,53*	-
Diferencia de tratamiento contra ezetimiba (%)	-	-26,73*	-29,62*	-36,68*	-	-25,17*	-29,34*	-34,14*	-

SC: subcutáneo Q2W: cada 2 semanas; Q4W: cada 4 semanas o una vez por mes;
QD: una vez por día
* P < 0,001

EJEMPLO 25

Un estudio doble ciego, aleatorizado, controlado por placebo, con rango de dosis para evaluar la tolerabilidad y la eficacia de un anticuerpo Anti-PCSK9 humano sobre el LDL-C en combinación con inhibidores de HMG-Co-A reductasa en pacientes con hipercolesterolemia

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de 12 semanas del anticuerpo anti-PCSK9 humano (anticuerpo monoclonal 21B12) subcutáneo (SC) cada 2 semanas (Q2W) o cada 4 semanas (Q4W) en comparación con el placebo, sobre el cambio porcentual con respecto al valor de referencia en el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) cuando se utiliza con un inhibidor de HMG-Co-A reductasa (p. ej., una estatina) en sujetos con hipercolesterolemia.

Este estudio es un ensayo clínico doble ciego, aleatorizado, estratificado, controlado por placebo, con grupo paralelo y con rango de dosis para el anticuerpo anti-PCSK9 humano, el anticuerpo monoclonal, 21B12 en el cual se inscribieron 631 sujetos. Los sujetos que reciben dosis estables durante al menos 4 semanas de una terapia con estatinas, con o sin ezetimiba y que cumplen con todos los criterios de inclusión/exclusión serán aleatorizados con las mismas probabilidad en 8 grupos de tratamiento: anticuerpo monoclonal 21B12 subcutáneo (SC) (70 mg Q2W, 105 mg Q2W, 140 mg Q2W, 280 mg Q4W, 350 mg Q4W y 420 mg Q4W, placebo Q2W SC o placebo Q4W SC). La aleatorización se estratificará según el nivel de LDL-C de selección (< 130 mg/dL [3,4 mmol/L] contra $\geq$ 130 mg/dL) y el uso de ezetimiba en el inicio (sí contra no). La aleatorización debe realizarse dentro de 5 a 10 días de la evaluación del LDL-C de selección utilizada para determinar la elegibilidad. Las visitas del estudio son cada 2 semanas, independientemente de que el sujeto recibiera tratamiento Q2W SC o Q4W. Los 3 grupos de dosis Q2W del anticuerpo monoclonal 21B12 y el grupo de placebo Q2W serán cegados entre sí y los 3 grupos de dosis Q4W y el grupo de placebo Q4W serán cegados entre sí. La visita de final del estudio y el último cálculo de los lípidos fue en la semana 12 para los sujetos con el plan Q4W IP y en la semana 14 para los sujetos con el plan Q2W IP.

Para este estudio son elegibles hombres y mujeres, $\geq 18 \leq 80$ años. Para la inscripción, los sujetos deben estar tomando una estatina, con o sin ezetimiba, con dosis estables durante al menos 4 semanas antes de la evaluación de LDL-C y no deben requerir ajuste ascendente. En el momento de la evaluación, el LDL-C en ayunas debe ser ≥ 85 mg/dL (2,2 mmol/L). La inscripción de sujetos con LDL-C en ayunas en la selección de entre ≥ 85 mg/dL (2,2 mmol/L) y < 100 mg/dL (2,6 mmol/L) se limitará a no más de aproximadamente el 20 % de la inscripción planificada total. Los triglicéridos en ayunas deben ser ≤ 400 mg/dL (4,5 mmol/L) según lo determine el análisis del laboratorio central en la selección.

Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 39,22 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el LDL-C con

respecto al valor de referencia del 56,38 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 68,76 % (los datos no se muestran). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una

5 reducción porcentual promedio de LS en Lp(a) con respecto al valor de referencia del 21,17% al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en Lp(a) con respecto al valor de referencia del 33,41% al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en Lp(a) con respecto al valor de

10 referencia del 33,87% (los datos no se muestran). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) presentaron un aumento porcentual promedio de LS en el HDL-C con respecto al valor de referencia del 21,17% al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) presentaron un aumento porcentual promedio de LS en el HDL-C con respecto al valor de referencia del 6,80 % al final

15 del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) presentaron un aumento porcentual promedio de LS en el HDL-C con respecto al valor de referencia del 8,43% (los datos no se muestran). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el VLDL-C con respecto al valor de referencia del 14,84% al final del intervalo de dosificación; los sujetos

20 tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el VLDL-C con respecto al valor de referencia del 12,75% al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el VLDL-C con respecto al valor de referencia del 45,14% (los datos no se muestran). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12

25 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en los triglicéridos con respecto al valor de referencia del 7,20 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en los triglicéridos con respecto al valor de referencia del 5,65 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual

30 promedio de LS en los triglicéridos con respecto al valor de referencia del 17,60 % (los datos no se muestran). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el no-HDL-C con respecto al valor de referencia del 36,20 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el no-HDL-

C con respecto al valor de referencia del 51,20 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el no-HDL-C con respecto al valor de referencia del 64,61 % (los datos no se muestran). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el colesterol total con respecto al valor de referencia del 26,33 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el colesterol total con respecto al valor de referencia del 36,91 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el colesterol total con respecto al valor de referencia del 46,17 % (los datos no se muestran).

Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg (Q4W) de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 42,62 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 56,84 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el LDL-C con respecto al valor de referencia del 52,19 % (los datos no se muestran). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en Lp(a) con respecto al valor de referencia del 22,54 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en Lp(a) con respecto al valor de referencia del 29,43 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en Lp(a) con respecto al valor de referencia del 23,29 % (los datos no se muestran). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q2W) presentaron un aumento porcentual promedio de LS en el HDL-C con respecto al valor de referencia del 2,17 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 (Q2W) presentaron un aumento porcentual promedio de LS en el HDL-C con respecto al valor de referencia del 6,92 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 (Q2W) presentaron un aumento porcentual promedio de LS en el HDL-C con respecto al valor de referencia del 7,42 % (los datos no se muestran). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el VLDL-C con respecto al valor de referencia del 18,12 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos

tratados con 350 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el VLDL-C con respecto al valor de referencia del 20,89 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el VLDL-C con respecto al valor de referencia del 28,66 % (los datos no se muestran). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en los triglicéridos con respecto al valor de referencia del 6,75 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en los triglicéridos con respecto al valor de referencia del 9,17 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en los triglicéridos con respecto al valor de referencia del 11,13 % (los datos no se muestran). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el no-HDL-C con respecto al valor de referencia del 38,89 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el no-HDL-C con respecto al valor de referencia del 50,83 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el no-HDL-C con respecto al valor de referencia del 48,54 % (los datos no se muestran). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el colesterol total con respecto al valor de referencia del 28,08 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el colesterol total con respecto al valor de referencia del 36,04 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 (Q2W) presentaron una reducción porcentual promedio de LS en el colesterol total con respecto al valor de referencia del 42,76 % (los datos no se muestran).

EJEMPLO 26

ABP de PCSK9 reguló adicionalmente el LDLR en presencia de estatinas

Este ejemplo demuestra que las ABP para PCSK9 produjeron mayores aumentos en la disponibilidad de LDLR cuando se utilizaron en presencia de estatinas, lo que demuestra que se pueden obtener mayores beneficios a través del uso combinado de las dos.

Se sembraron células HepG2 en DMEM con 10 % de suero bovino fetal (FBS) y se cultivaron hasta el ~90 % de confluencia. Se trataron las células con las cantidades indicadas de mevinolina (una estatina, Sigma) y ABP para PCSK9 (figuras 12A-12C) en DMEM con 3 %

de FBS durante 48 horas. Se prepararon lisados celulares totales. Se separaron 50 mg de las proteínas totales mediante electroforesis en gel y se transfirieron a una membrana PVDF. Se realizaron inmunoensayos utilizando el anticuerpo del receptor de LDL antihumano de conejo (Fitzgerald) o el anticuerpo de b-actina antihumano de conejo. Los resultados quimioluminiscentes potenciados se muestran en los paneles superiores de las figuras 12A-12C. Se cuantificó la intensidad de las bandas mediante software ImageJ y se normalizó con b-actina. Los niveles relativos de LDLR se muestran en los paneles inferiores de las figuras 12A-12C. ABP 21B12 y 31H4 son anticuerpos neutralizantes de PCSK9, mientras que 25A7.1 es un anticuerpos no neutralizante.

También se crearon células HepG2-PCSK9. Estas eran la línea celular HepG2 estable transfectada con PCSK9 humana. Se sembraron las células en DMEM con 10 % de suero bovino fetal (FBS) y se cultivaron hasta el ~90 % de confluencia. Se trataron las células con las cantidades indicadas de mevinolina (Sigma) y ABP para PCSK9 (figuras 12D-12F) en DMEM con 3 % de FBS durante 48 horas. Se prepararon lisados celulares totales. Se separaron 50 mg de las proteínas totales mediante electroforesis en gel y se transfirieron a una membrana PVDF. Se realizaron inmunoensayos utilizando el anticuerpo del receptor de LDL antihumano de conejo (Fitzgerald) o el anticuerpo de b-actina antihumano de conejo. Los resultados quimioluminiscentes potenciados se muestran en los paneles superiores. Se cuantificó la intensidad de las bandas mediante software ImageJ y se normalizó con b-actina.

Como se puede observar en los resultados ilustrados en las figuras 12A-12F, generalmente, las cantidades crecientes del anticuerpo neutralizante y las cantidades crecientes de la estatina provocaron aumentos en el nivel de LDLR. Este aumento en la efectividad para los niveles crecientes de ABP se refleja especialmente en las figuras 12D-12F, en donde las células también se transfectaron con PCSK9 y esto les permitió a las ABP demostrar su efectividad en mayor medida.

De manera interesante, como se demostró mediante los resultados en la comparación de las figuras 12D-12F con 12A-12C, la influencia de las concentraciones de ABP sobre los niveles de LDLR aumentó drásticamente cuando PCSK9 era producida por las células. Además, está claro que las ABP neutralizantes (21B12 y 31H4) provocaron un mayor aumento en los niveles de LDLR, incluso en presencia de las estatinas, que ABP 25A7.1 (no neutralizadora), lo que demuestra que se pueden lograr beneficios adicionales mediante el uso de estatinas y ABP para PCSK9.

EJEMPLO 27

Secuencias de consenso

Se determinaron las secuencias de consenso utilizando análisis filogénicos de las CDR correspondientes a V_H y V_L de las ABP anti-PCSK9. Se determinaron las secuencias de consenso manteniendo las CDR contiguas dentro de la misma secuencia correspondiente a un V_H o V_L. En resumen, se convirtieron las secuencias de aminoácidos correspondientes a los dominios variables completos de V_H o V_L al formato FASTA para facilitar el procesamiento de los alineamientos comparativos e inferir las filogenias. Después, se reemplazaron las regiones marco de estas secuencias con una secuencia ligadora artificial (marcadores de posición "bbbbbbbbbb", construcción de ácido nucleico no específica) para que se pudiera realizar el análisis de las CDR solas sin introducir ninguna desviación en el peso de las posiciones de aminoácidos debido a eventos coincidentes (p. ej., anticuerpos no relacionados que casualmente comparte una herencia de marco germinal común) manteniendo las CDR contiguas dentro de la misma secuencia correspondiente a un V_H o V_L. Se sometieron secuencias de V_H o V_L de este formato a interrogación de alineamiento de similitud de secuencia utilizando un programa que emplea un algoritmo tipo ClustalW (véase Thompson y col., 1994, *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680). Se empleó una penalización por creación de huecos de 8,0 junto con una penalización por extensión de espacios de 2,0. Este programa también generó filogramas (ilustraciones de árboles filogenéticos) basados en alineamientos de similitud de secuencia utilizando UPGMA (método del grupo de pares no ponderados con medias aritméticas) o métodos de unión de vecinos (véase, Saitou y Nei, 1987, *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425) para construir y mostrar la similitud y la distinción de los grupos de secuencias a través de la comparación y agrupación de la longitud de las ramas. Ambos métodos produjeron resultados similares, pero los árboles derivados de UPGMA se utilizaron en última instancia porque el método emplea un conjunto de supuestos más simple y más conservador. Se generaron árboles derivados de UPGMA en donde se definieron grupos similares de secuencias por tener menos de 15 sustituciones por 100 residuos (véase la leyenda en las ilustraciones de los árboles para la escala) entre las secuencias individuales del grupo y se utilizaron para definir las recolecciones de la secuencia de consenso. Los resultados de las comparaciones se muestran en las figuras 13A-13J y 48-49. En la figura 13E, se eligieron los grupos de modo que las secuencias de la cadena ligera que forman un clado también sean un clado en la cadena pesada y que tienen menos de 15 sustituciones.

EJEMPLO 28

Preparación de formulaciones de ABP PCSK9
UF/DF – Metodología de ultrafiltración/diafiltración
Se cambió el tampón de la sustancia farmacológica, p. ej., el anticuerpo 21B12 y el

anticuerpo 11F1, por tampón de formulación, incluido un estabilizador, con un sistema Millipore TFF UF/DF de balanza de banco utilizando una membrana de filtro Millipore Pellicon XL, tamaño 50 cm² (celulosa regenerada, 30.000 de peso molecular de corte). La etapa de diafiltración se realizó hasta que se intercambiaron por lo menos diez volúmenes de tampón de diafiltración. Una vez que se completó la etapa de diafiltración, el sistema de UF/DF se cambió a modo de ultrafiltración y se concentró cada formulación a los niveles de concentración objetivo.

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

Antes de llenar los recipientes principales, se filtró asépticamente cada formulación bajo una campana de flujo laminar y utilizando un filtro de 0,2 micras. El llenado también se realizó asépticamente y se llevó a cabo manualmente o automáticamente con los instrumentos de llenado apropiados.

15

EJEMPLO 29

Formulaciones de ABP PCSK9 de alta concentración con baja viscosidad

Para evaluar los efectos de diferentes excipientes sobre la viscosidad de las concentraciones de proteínas altas, se realizó un ensayo de selección de viscosidad, estabilidad y solubilidad para analizar moduladores de viscosidad excipientes para formulaciones de proteínas de alta concentración. Específicamente, toda la preparación de la muestra, p. ej., la muestra del anticuerpo 21B12, se llevó a cabo asépticamente bajo una campana de flujo laminar. La liofilización de las muestras del ensayo permitió un método simple para lograr altas concentraciones de proteínas. Se introdujeron con pipeta 1,5 mL de proteína 70 mg/mL (p. ej., 21B12) en frascos de vidrio de 3 cc para la liofilización. Se realizó la liofilización utilizando un ciclo de liofilización genérico en un liofilizador VirTis Lab Scale. El tampón de liofilización fue L-glutamato 10 mM con 1,0 % de sucrosa, pH 4,8. Se reconstituyeron individualmente muestras liofilizadas (p. ej., la muestra de 21B12 liofilizada) con aproximadamente 0,65 mL de los tampones excipientes, que se muestran en la tabla 13 a continuación, a una concentración de proteínas final de 150-200 mg/mL. Las muestras reconstituidas se dejaron reposar durante la noche para permitir la disolución completa. Se midió la viscosidad como se describe a continuación.

30

TABLA 13

Tipo de excipiente	Nivel de excipiente	pH ajustado
Aminoácidos	150 mM L-Alanina	pH 4,5
	150 mM L-Glicina	pH 4,2
	75 mM L-Lisina	pH 4,2
	150 mM L-Metionina	pH 4,5
	150 mM L-Prolina	pH 4,2
	150 mM L-Serina	pH 4,2
	70 mM L-Arginina	pH 4,5
	150 mM L-Serina	pH 4,4
Sales	30 mM Cloruro de magnesio	pH 4,2
	70 mM Cloruro de sodio	pH 4,2
	30 mM Cloruro de calcio	pH 4,4
	50 mM Sulfato de sodio	pH 4,1
	30 mM Cloruro de zinc	pH 4,7
Polioles	150 mM Glicerol	pH 4,5
	150 mM Sucrosa	pH 4,2
Otro	150 mM Carnitina	pH 4,8
	150 mM Creatinina	pH 5,0
	150 mM Taurina	pH 4,4

Los resultados del análisis de viscosidad, estabilidad, solubilidad mostró cambios en la viscosidad de 21B12 después del añadido de diversos excipientes (figura 26). No todos los excipientes utilizados con fines de evaluación provocaron una disminución de la viscosidad de la solución; el añadido de L-alanina, glicerol, sulfato de sodio, sucrosa y cloruro de zinc provocó una mayor viscosidad en comparación con la muestra de control. Varios excipientes utilizados en la evaluación parecieron ser buenos candidatos para la modulación de la viscosidad, por ejemplo, L-arginina, carnitina, creatinina, L-metionina y taurina.

Para evaluar los efectos de las diferentes formulaciones sobre la viscosidad de un ABP PCSK9 específico, se formularon composiciones de 21B12 en seis formulaciones diferentes que se muestran en la tabla 29.2 a continuación. La concentración de 21B12 en todas las formulaciones fue 134 mg/ml. Las composiciones se llenaron hasta un volumen final de 1,0 ml en frascos. Las composiciones se incubaron a temperatura ambiente (es decir, 25 °C).

Diálisis y concentración de 21B12

La remoción de la sucrosa de 21B12 originariamente en acetato de sodio 10 mM, 9,0 % (p/v) de sucrosa se logró mediante diálisis a través del añadido de aproximadamente 10 mL de 21B12 a casetes de diálisis Slide-A-Lyzer de Pierce (Rockford, IL) y dializado contra 2 L de tampón a 4 °C durante 3 ciclos (2 horas x 2 y 16 horas x 1) para un intercambio de tampón completo. El tampón para diálisis contenía acetato de sodio 10 mM (hecho de ácido acético) a pH 5,0. Posteriormente, todas las muestras se concentraron utilizando dispositivos Millipore Amicon UltraPrep (Billerica, MA) en una centrífuga Beckman Coulter Allegra 6R

(Fullerton, California) a 3000 rpm hasta que el volumen de la muestra se encontró ligeramente por debajo del volumen requerido para la concentración deseada.

Se llevó a cabo la determinación de la concentración mediante la medición de la absorbancia a A280 utilizando un espectrofotómetro Agilent 8453 (Santa Clara, California). Se calculó la concentración de proteínas utilizando el coeficiente de extinción adecuado. Se añadió la cantidad adecuada de tampón a la muestra para diluirla a la concentración deseada y se realizó otro A280 para obtener la concentración final para el experimento.

Añadido de estabilizadores que también pueden actuar para bajar la viscosidad:

Se evaluaron excipientes, como la prolina, alcohol bencílico, creatinina, metionina, taurina, etc., en un intento de reducir la viscosidad. Estos excipientes se añadieron individualmente a las muestras de formulación de 21B12 a partir de soluciones madre de altas concentraciones.

Mediciones de viscosidad

Se midió la viscosidad utilizando un viscosímetro de cono y placa Brookfield LV-DVII (Middleboro, Massachusetts) con un vástago CPE-40 con igual temperatura de frasco para muestras regulada por un baño de agua circulante a 25 °C constantes. Se añadieron 500 ul de la muestra al frasco para muestras con pipeta de desplazamiento positivo. Después de fijar el frasco para muestras, se aumentó gradualmente la velocidad rotacional del vástago hasta lograr un torque de aproximadamente el 80 %. En este momento, se detuvo la velocidad rotacional y se generó una lectura de viscosidad mediante el software Rheocalc.

TABLA 14

Tampón	Estabilizador	Estabilizador/Excipientes añadidos para reducir la viscosidad	Viscosidad (cP)
10 mM acetato de Na			42,4
10 mM acetato de Na	9,0 % sucrosa	2 % L-Prolina (174 mM)	20,3
10 mM acetato de Na	9,0 % sucrosa	3 % L-Prolina (261 mM)	17,9
10 mM acetato de Na	9,0 % sucrosa	3 % alcohol bencílico	17,8
10 mM acetato de Na	9,0 % sucrosa	150 mM Creatinina	11,97
10 mM acetato de Na	9,0 % sucrosa	150 mM L-Metionina	16,0
10 mM acetato de Na	9,0 % sucrosa	150 mM L-Taurina	16,8

Los resultados muestran que la L-prolina, el alcohol bencílico, la creatinina, la

metionina y la taurina presentaron un efecto reductor de la viscosidad significativo en altas concentraciones de ABP PCSK9, 21B12 (véase la tabla 14).

5 Para continuar evaluando los efectos de las diferentes formulaciones sobre un ABP PCSK9 específico, se formularon composiciones de 21B12 en formulaciones diferentes que se muestran en la tabla 15 a continuación. Las formulaciones se encuentran en tres grupos: (1) un conjunto de varias concentraciones de 21B12 en tampón acetato de sodio 10 mM, pH 5,2, (2) un conjunto de varias concentraciones de 21B12 en tampón acetato de sodio 10 mM, pH 5,2 con 3 % (aproximadamente 261 mM) de L-Prolina adicionado a cada muestra y (3) un conjunto de muestras de 21B12 concentradas a aproximadamente 117-134 mg/mL en tampón acetato de
10 sodio 10 mM a diferentes niveles de pH (4,0 a 5,5) más dos muestras en tampón acetato de sodio 10 mM, pH 5,2 con NaCl o una combinación de L-Metionina/alcohol bencílico añadida.

TABLA 15

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

Los resultados mostraron que L-Prolina presentaba un efecto reductor de la viscosidad significativo en altas concentraciones de ABP PCSK9, 21B12 (véase la figura 27).

Para continuar evaluando los efectos de las diferentes formulaciones sobre un ABP PCSK9 específico, se formularon composiciones de 21B12 en formulaciones diferentes que se muestran en la tabla 16 a continuación.

TABLA 16

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

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

Para continuar evaluando los efectos de las diferentes formulaciones sobre un ABP PCSK9 específico, se formularon composiciones de 21B12 en formulaciones diferentes que se muestran en la tabla 17 a continuación.

TABLA 17:

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

Los resultados muestran la capacidad de obtener altas concentraciones de proteína 21B12 con viscosidad reducida con formulaciones con estabilizadores/excipientes específicos (véanse las figuras 28A-28D). Específicamente, la figura 28A es una gráfica que muestra la viscosidad de diversas concentraciones del anticuerpo anti-PCSK9, 21B12, en una formulación que comprende 10 mM de acetato de sodio y el 9 % de sucrosa, pH 5,2, a 25 °C y 40 °C.

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

La figura 28C es una gráfica que muestra la viscosidad de diversas concentraciones del anticuerpo anti-PCSK9, 21B12, en una formulación que comprende 10 mM de acetato de sodio y el 9 % de sucrosa, pH 5,2, a 25 °C y 40 °C, en comparación con una formulación que

comprende 10 mM de acetato de sodio, 100 mM de metionina y el 4% de sucrosa, pH 5,0, a 25 °C y 40 °C.

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

EJEMPLO 30

Estudios de viscosidad de 11F1 de concentración alta

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

Se preparó solución madre de alta concentración de 11F1 de manera similar a la descrita para 21B12 en el ejemplo 29 anterior. Se llevó a cabo la determinación de la concentración mediante la medición de la absorbancia a A280 utilizando un espectrofotómetro Agilent 8453 (Santa Clara, California). Se calculó la concentración de proteínas utilizando el coeficiente de extinción adecuado. Se añadió la cantidad adecuada de tampón a la muestra para diluirla a la concentración deseada y se realizó otro A280 para obtener la concentración final para el experimento. Los excipientes se añadieron individualmente a las muestras de formulación de 11F1 derivadas de las soluciones madre de altas concentraciones.

Se midió la viscosidad utilizando un viscosímetro de cono y placa Brookfield LV-DVII (Middleboro, Massachusetts) con un vástago CPE-40 con igual temperatura de frasco para muestras regulada por un baño de agua circulante a 25 °C constantes. Se añadieron 500 µL de la muestra al frasco para muestras con pipeta de desplazamiento positivo. Después de fijar el frasco para muestras, se aumentó gradualmente la velocidad rotacional del vástago hasta lograr un torque de aproximadamente el 80 %. En este momento, se detuvo la velocidad rotacional y se generó una lectura de viscosidad mediante el software Rheocalc.

Las formulaciones de proteínas de alta concentración se midieron ocasionalmente utilizando un tipo diferente de viscosímetro, un Anton Paar Physica modelo MCR300 con un vástago CP50-1. Se utiliza una muestras de 600 uL en este instrumento y se utilizó el software Rheoplus versión 3.4 para calcular la viscosidad de la solución. No hubo gran diferencia en las mediciones utilizando los distintos viscosímetros.

TABLA 30

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

Los resultados que se muestran en la tabla 30 demuestran la capacidad de obtener altas concentraciones de anticuerpo 11F1 con viscosidad relativamente baja en formulaciones con estabilizadores/excipientes específicos. Las formulaciones que comprenden los estabilizadores metionina, prolina, arginina, glicina, serina y alanina presentaron una viscosidad particularmente más baja.

5

EJEMPLO 31

Estudio de estabilidad de formulaciones de ABP PCSK9 de alta concentración

Para evaluar los efectos de la estabilidad sobre las formulaciones de ABP PCSK9 con alta concentración de proteínas, se formularon composiciones de 21B12 en formulaciones diferentes que se muestran en la tabla 31.1 a continuación. Se incubaron las formulaciones en los recipientes indicados a -30 °C o 4 °C durante 0 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses y 6 meses y 1 año. Para cada formulación en cada momento, se extrajo una muestra de cada paquete para monitorizar el monómero del anticuerpo mediante HPLC de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) nativa y detección de partículas subvisibles por oscurecimiento de la luz (HIAC).

Tabla 31.1

Formulaciones	Conc. 21B12 (mg/mL)	Vol. de llenado (mL)	Paquete	Tampón	Excipientes	Polisorbato 80	pH objetivo
1	110	3,0	Frasco 5 cc	10 mM acetato de Na	9,0 % de sucrosa	0,010 %	5,2
2	120	3,0	Frasco 5 cc	10 mM acetato de Na	100 mM metionina, 4 % de sucrosa	0,010 %	5,0
3	120	3,0	Frasco 5 cc	10 mM acetato de Na	250 mM prolina	0,010 %	5,0
4	110	1,0	Jeringa de vidrio BD	10 mM acetato de Na	9,0 % de sucrosa	0,010 %	5,2
5	120	1,0	Jeringa de vidrio BD	10 mM acetato de Na	100 mM metionina, 4 % de sucrosa	0,010 %	5,0
6	120	1,0	Jeringa de vidrio BD	10 mM acetato de Na	250 mM prolina	0,010 %	5,0
7	110	1,2	Jeringa de plástico CZ	10 mM acetato de Na	9,0 % de sucrosa	0,010 %	5,2
8	120	1,2	Jeringa de plástico CZ	10 mM acetato de Na	100 mM metionina, 4 % de sucrosa	0,010 %	5,0
9	120	1,2	Jeringa de plástico CZ	10 mM acetato de Na	250 mM prolina	0,010 %	5,0

SEC-HPLC:

SEC-HPLC separa las proteínas según las diferencias en sus volúmenes hidrodinámicos. Las moléculas con volúmenes de proteínas hidrodinámicas más grandes se eluyen antes que las moléculas con volúmenes más pequeños. Se realizó SEC-HPLC nativa utilizando una columna TSK-GEL G3000SWXL 7,8 mm x 300 mm (Tosoh Bioscience), con tamaño de partícula de 5 µm, sobre una HPLC Agilent con un detector de longitud de onda variable. La fase móvil fue fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 6,8 ±0,1. La velocidad de flujo fue 0,5 mL/minuto. Se monitorizó el eluato de la columna a 280 nm. Se utilizaron las áreas pico integradas en los cromatogramas para cuantificar las cantidades de monómeros y las especies de alto peso molecular.

10

Tabla 31.2:

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

15

La tabla 31.2 muestra los resultados del análisis SEC-HPLC nativo de las formulaciones 21B12 enumeradas en la tabla 31.1 incubada a X °C durante 0 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses y 6 meses. “% HMW” refleja la cantidad de monómero de 21B12 de alto peso molecular en una muestra. Estos resultados indican que no se observaron problemas de formulación después de 6 meses; sin embargo, algunas especies de alto peso molecular aumentaron en la formulación de metionina (es decir, las formulaciones 2, 5 y 8).

Detección de partículas subvisibles por oscurecimiento de la luz (HIAC):

Un sistema electrónico, en base a líquido, de conteo de partículas (HIAC/Royco 9703 o equivalente) que contiene un sensor de oscurecimiento de la luz (HIAC/Royco HRLD-150 o equivalente) con un muestreador líquido cuantifica la cantidad de partículas y su intervalo de tamaño en determinada muestra de prueba. Cuando las partículas de un líquido pasan entre la fuente de luz y el detector, disminuyen u “oscurecen” el rayo de luz que cae sobre el detector. Cuando la concentración de partículas se encuentra dentro del intervalo normal del sensor, estas partículas se detectan una por una. El pasaje de cada partícula a través de la zona de detección reduce la luz incidente sobre el fotodetector y la salida de voltaje del fotodetector se reduce momentáneamente. Los cambios en los voltajes se registran como pulsos eléctricos que son convertidos por el instrumento en la cantidad de partículas presentes. El método es no específico y mide las partículas independientemente de su origen. Los tamaños de partículas que fueron monitorizados fueron 10 µm y 25 µm.

En este ejemplo, se realizó un análisis HIAC utilizando muestras que habían estado almacenadas a 4°C. Específicamente, las muestras de las formulaciones de 21B12 en la tabla 31.1 se sometieron a vacío (también denominado “desgasificación”) para eliminar las burbujas de aire que se podían detectar como partículas en el sistema de conteo de partículas. Para las muestras de 21B12, el método fue someter las muestras a vacío a 75 torr durante 1 a 2 horas. El conteo de partículas se realizó dentro de las 2 horas de completado el proceso de desgasificación.

Las figuras 29A y 29B muestran los resultados del análisis HIAC para las formulaciones identificadas anteriormente incubadas en recipientes durante 0 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses y 6 meses. Se contaron partículas de 10 µm y 25 µm. Las figuras 29A y 29B demostraron que todas las formulaciones de 21B12 fueron estables según lo medido con HIAC. Aunque las formulaciones en jeringas de vidrio, es decir, las formulaciones 4-6, mostraron mayores niveles de partículas entre la concentración de proteínas y la formulación, estos conteos de partículas se encuentran por debajo de los límites de USP para cada tamaño de partícula (10 µm y 25 µm). Los límites USP para las partículas de 10 µm son 6000 por recipiente y para las partículas de 25 µm, 600 por recipiente.

EJEMPLO 32

Estudios de estabilidad de 11F1

Para estudiar las formulaciones de alta concentración (150 mg/mL) de 11F1, se realizaron varias formulaciones utilizando los excipientes candidatos como se indica en la tabla 32A a continuación. Se almacenaron las formulaciones en los recipientes indicados a -30 °C o

4°C durante al menos seis meses.

Tabla 32A: formulaciones estudiadas

Nombre de la formulación	Conc. objetivo (mg/mL)	Recipiente	Tampón ^a	Excipientes objetivo	Polisorbato 20	pH ^c final
1	150	Frasco de vidrio 5 cc	10 mM acetato de Na	9,0 % de sucrosa	0,010 %	5,2
2	150	Jeringa de vidrio BD	10 mM acetato de Na	9,0 % de sucrosa	0,010 %	5,2
3	150	Jeringa de vidrio BD	10 mM acetato de Na	150 mM metionina, 3 % de sucrosa	0,010 %	5,2
4	150	Jeringa de vidrio BD	10 mM acetato de Na	250 mM prolina	0,010 %	5,2
5	150	Jeringa de plástico CZ	10 mM acetato de Na	9,0 % de sucrosa	0,010 %	5,2
6	150	Jeringa de plástico CZ	10 mM acetato de Na	150 mM metionina, 3 % de sucrosa	0,010 %	5,2
7	150	Jeringa de plástico CZ	10 mM acetato de Na	250 mM prolina	0,010 %	5,2

Se evaluó la especie de % HMW mediante HPLC de exclusión por tamaño después de almacenamiento a -30°C y 4°C en los momentos indicados en la tabla 32B a continuación. En resumen, la HPLC de exclusión por tamaño separa las proteínas según las diferencias en sus volúmenes hidrodinámicos. Las moléculas con volúmenes de proteínas hidrodinámicas más grandes se eluyen antes que las moléculas con volúmenes más pequeños. Se realizó SEC-HPLC nativa utilizando una columna TSK-GEL G3000SWXL 7,8 mm x 300 mm (Tosoh Bioscience), con tamaño de partícula de 5 µm, sobre una HPLC Agilent con un detector de longitud de onda variable. La fase móvil fue fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 6,8 +/- 0,1. La velocidad de flujo fue 0,5 mL/minuto. Se monitorizó el eluato de la columna a 280 nm. Se utilizaron las áreas pico integradas en los cromatogramas para cuantificar las cantidades de monómeros y las especies de alto peso molecular.

TABLA 32 B

%HMW a -30 °C			%HMW a 4 °C			
Formulaciones	T=0	T=4M	T=0	T=2M	T=4M	T=6M
1	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05
2	0,05	0,05	0,05	0,06	0,04	0,02
3	0,07	0,26	0,07	0,07	0,07	0,06
4	0,06	0,07	0,06	0,07	0,06	0,08
5	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,06
6	0,06	0,32	0,06	0,06	0,06	0,06
7	0,08	0,07	0,08	0,06	0,07	0,08

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

Se evaluó la estabilidad de otras formulaciones de 11F1 de alta concentración mediante la preparación de las formulaciones en los recipientes principales como se indica en la

Tabla 32C a continuación:

Tabla 32 C

Formulación	Conc. de 11F1 (mg/mL)	Recipiente principal	Excipientes	0,010 % polisorbato	Tampón	pH final
10	150	Frascos de vidrio	9,0 % de sucrosa	PS 20	10 mM acetato de Na	5,2
20	150	Frascos de vidrio	9,0 % de sucrosa	PS 80	10 mM acetato de Na	5,2
30	180	Jeringa de vidrio BD	150 mM metionina, 3 % de sucrosa	PS 20	10 mM acetato de Na	5,2
40	180	Jeringa de vidrio BD	150 mM MET, 3 % de sucrosa	PS 80	10 mM acetato de Na	5,2
50	180	Jeringa de vidrio BD	250 mM prolina	PS 20	10 mM acetato de Na	5,2
60	180	Jeringa de vidrio BD	250 mM prolina	PS 80	10 mM acetato de Na	5,2
70	180	Jeringa de plástico CZ	150 mM metionina, 3 % de sucrosa	PS 20	10 mM acetato de Na	5,2
80	180	Jeringa de plástico CZ	150 mM metionina, 3 % de sucrosa	PS 80	10 mM acetato de Na	5,2
90	180	Jeringa de plástico CZ	250 mM prolina	PS 20	10 mM acetato de Na	5,2
100	180	Jeringa de plástico CZ	250 mM prolina	PS 80	10 mM acetato de Na	5,2

Se incubaron las formulaciones a 4 ° Celsius durante un año. En los momentos indicados en la tabla 32D a continuación, se extrajo una muestra de cada recipiente y se analizó mediante SEC-HPLC como se describió para la tabla 32B anterior.

5

Tabla 32D

% HMW de exclusión por tamaño se forma después de 1 año de almacenamiento a 4 °C

4 °C % HMW								
Formulations	T=0	T=2wk	T=4wk	T=6wk	T=6M	T=6.5M	T=1Yr	% Change
10	0.04	0.07	0.08	0.06	0.07	N/A	0.07	0.03
20	0.05	0.07	0.07	0.07	0.06	N/A	0.06	0.01
30	0.08	0.14	N/A	N/A	N/A	N/A	0.05	-0.03
40	0.09	0.15	0	N/A	N/A	N/A	0.06	-0.03
50	0.08	0.15	0	0	N/A	N/A	0.07	-0.01
60	0.07	0.16	0	0	N/A	N/A	0.08	0.01
70	0.08	0.14	0	0	N/A	0.09	0.06	-0.02
80	0.07	0.14	0	0	N/A	N/A	0.07	0.00
90	0.09	0.15	0	0	N/A	0.09	0.05	-0.04
100	0.08	0.15	0	0	N/A	N/A	0.08	0.00

En los momentos indicados en la tabla 32E a continuación, se extrajo una muestra de cada recipiente y se analizó mediante HPLC de intercambio catiónico (CEX-HPLC). La HPLC de intercambio catiónico separa las proteínas según las diferencias en su carga superficial. A un pH fijo, se separan las isoformas cargadas de 11F1 en una columna de intercambio catiónico y se eluyen utilizando un gradiente salino. Se monitoriza el eluyente mediante absorbancia de UV. La distribución de la isoforma cargada se evalúa determinando el área pico de cada isoforma como un porcentaje del área pico total.

Se realizó CEX-HPLC nativa utilizando una columna Dionex G3000SWXL 4,0 mm ID x 250 mm (Tosoh Bioscience), con tamaño de partícula de 10 µm, sobre una HPLC Agilent con un detector de longitud de onda variable. La fase móvil fue un gradiente lineal de 20 mM MES, pH 6,0 +/-0,1 y el mismo tampón con cloruro de sodio 500 mM. La velocidad de flujo fue 0,6 mL/minuto. Se monitorizó el eluato de la columna a 280 nm. Se utilizaron las áreas pico integradas en los cromatogramas para cuantificar las cantidades de isoformas cargadas de manera diferente.

Tabla 32E

Pico de isoforma principal %, HPLC de intercambio catiónico después de 1 año de almacenamiento a 4 °C

Pico de isoforma principal % 4 °C						
Formulación	T=0	2W	4W	6W	1Y	% cambio
10	76,0	75,9	75,7	75,6	76,2	0,3
20	76,0	76,4	75,7	75,6	76,4	0,5
30	76,0	N/A	N/A	N/A	76,3	0,4
40	75,8	N/A	N/A	N/A	76,0	0,2
50	76,0	N/A	N/A	N/A	76,3	0,4
60	75,8	N/A	N/A	N/A	75,8	0,1
70	75,9	N/A	N/A	N/A	76,2	0,5
80	76,1	N/A	N/A	N/A	76,3	0,3
90	76,0	N/A	N/A	N/A	76,0	0,0
100	75,8	N/A	N/A	N/A	75,9	0,0

Las tablas 32D y 32E demuestran que las formulaciones de 11F1 descritas presentaron menos del 5 % de aumento en % HMW (SEC-HPLC) o menos de una variación de 3-5 % en el pico de isoforma principal (CATION HPLC) después de hasta 1 año de almacenamiento a 4 °C. De hecho, los cambios en ambos parámetros fueron muy bajos, lo que indica que son formulaciones muy estables.

Detección de partículas subvisibles por oscurecimiento de la luz (HIAC):

Un sistema electrónico, en base a líquido, de conteo de partículas (HIAC/Royco 9703 o equivalente) que contiene un sensor de oscurecimiento de la luz (HIAC/Royco HRLD-150 o equivalente) con un muestreador líquido cuantifica la cantidad de partículas y su intervalo de tamaño en determinada muestra de prueba. Cuando las partículas de un líquido pasan entre la fuente de luz y el detector, disminuyen u “oscurecen” el rayo de luz que cae sobre el detector. Cuando la concentración de partículas se encuentra dentro del intervalo normal del sensor, estas partículas se detectan una por una. El pasaje de cada partícula a través de la zona de detección reduce la luz incidente sobre el fotodetector y la salida de voltaje del fotodetector se reduce momentáneamente. Los cambios en los voltajes se registran como pulsos eléctricos que son convertidos por el instrumento en la cantidad de partículas presentes. El método es no específico y mide las partículas independientemente de su origen. Los tamaños de partículas que fueron monitorizados fueron 10 µm y 25 µm.

En este ejemplo, se realizó un análisis HIAC utilizando muestras que habían estado almacenadas a 4°C. Específicamente, las muestras de las formulaciones de 11F1 en la tabla 32a se sometieron a vacío (también denominado “desgasificación”) para eliminar las burbujas

de aire que se podían detectar como partículas en el sistema de conteo de partículas. Para las muestras de 11F1, el método fue someter las muestras a vacío a 75 torr durante 1 a 2 horas. El conteo de partículas se realizó dentro de las 2 horas de completado el proceso de desgasificación.

5 Las figuras 30A y 30B muestran los resultados de los ensayos HIAC para las formulaciones identificadas anteriormente incubadas en recipientes durante 0 semanas y cuatro meses. Se contaron partículas de 10 μm y 25 μm . Las figuras 30A y 30B demostraron que todas las formulaciones de 11F1 fueron estables según lo medido con HIAC. Los conteos de partículas para todas las formulaciones se encuentran por debajo de los límites de USP para
10 cada tamaño de partícula (10 μm y 25 μm). Los límites USP para las partículas de 10 μm son 6000 por recipiente y para las partículas de 25 μm , 600 por recipiente.

Ejemplo 33

Especificidad de unión a 11F1

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

La PCSK9 biotinilada, diluida en tampón A (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % BSA, 0,05 % tween, pH 7,5) estaba unida a placas de 96 pocillos recubiertas con neutravidina a una concentración de 0,2 $\mu\text{g/mL}$, para incubación durante una hora a temperatura ambiente. Por otra parte, se incubaron 0,4 $\mu\text{g/mL}$ de 11F1 durante una hora, a temperatura ambiente, con
20 diversas concentraciones (que oscilaron entre 0 y 20 $\mu\text{g/mL}$) de PCSK1, PCSK2, PCSK7, PCSK9 o furina (R&D Systems, Minneapolis, MN) (diluida en tampón A sin tween). El inhibidor de furina, a 4,5 $\mu\text{g/mL}$, se incluyó con todas las reacciones que contienen furina. Se lavó la placa de estreptavidina recubierta con PCSK9 con tampón A, se añadió la mezcla de anticuerpo/proteína convertasa a la placa y se incubó a temperatura ambiente durante una
25 hora. Después del lavado, se detectó el anticuerpo unido mediante incubación con Fc de α -human de cabra-HRP (160 ng/mL, diluido en tampón A) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) seguido del sustrato TMB. Se detuvo la reacción con HCl 1 N y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro Spectramax Plus 384 (Molecular Devices
30 Inc., Sunnyvale, CA).

Este ensayo se basó en la capacidad de la proproteína convertasa en solución de competir por la unión de 11F1 con la PCSK9 capturada en la placa. La preincubación de 11F1 y PCSK9 en solución redujo en forma sólida y dependiente de la dosis la cantidad de 11F1 que se unió a la PCSK9 capturada en las placas detectada como OD450 reducida (figura 31). Todos los resultados se expresaron como el valor OD450 promedio $\pm$ la desviación estándar contra la

concentración de la proproteína convertasa. La preincubación de 11F1 con PCSK1, PCSK2, PCSK7 o furina, en solución no afectó significativamente la unión de 11F1 a la PCSK9 capturada en las placas. Por lo tanto, a las concentraciones de proteínas estudiadas, 11F1 se une únicamente a PCSK9 y no a los otros miembros de la familia de la proproteína convertasa evaluados.

Ejemplo 33

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

El ejemplo demuestra que concentraciones nanomolares de 11F1 pueden inhibir la unión de D374Y y de PCSK9 natural a LDLR en las condiciones de este ensayo.

En resumen, se recubrieron placas de 384 pocillos transparentes con 2 µg/mL de anticuerpo del receptor anti-LDL de cabra (R&D Systems, Minneapolis, MN), diluido en PBS, mediante incubación durante la noche a 4 °C. Se lavaron completamente las placas con tampón A (cacodilato de sodio 100 mM, pH 7,5) y se bloquearon con tampón B (1 % de leche descremada seca [Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA] en tampón A) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se incubaron las placas con 0,4 µg/mL de receptor de LDL (R&D Systems, Minneapolis, MN) diluido en tampón C (tampón B complementado con CaCl₂ 10 mM) durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Simultáneamente a esta incubación, se incubaron 20 ng/mL de D374Y PCSK9 biotinilado o 100 ng/mL de PCSK9 WT biotinilado con diversas concentraciones del anticuerpo anti-PCSK9 11F1 diluido en tampón A (las concentraciones finales oscilaron entre 6,0 ng/mL y 200 ug/mL para el ensayo de PCSK9 D374Y o 3,1 ng/mL a 25 ug/mL para el ensayo de PCSK9 WT). Se lavaron las placas recubiertas con LDLR y se añadió la mezcla de PCSK9 biotinilada/anticuerpo. Se incubó la placa de LDLR durante 1 hora a temperatura ambiente. Se detectó la unión de PCSK9 biotinilada a LDLR mediante la incubación con estreptavidina-HRP (500 ng/mL en tampón C) seguido de sustrato TMB. Se detuvo la reacción con HCl 1 N y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro Spectramax Plus 384 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA). Se utilizó el software GraphPad Prism (v 4.01) para graficar el logaritmo de la concentración de anticuerpo contra OD450 para determinar los valores de IC₅₀ mediante regresión no lineal.

11F1 inhibió la unión de LDLR: PCSK9. Los valores de IC₅₀ para 11F1 en el ensayo de PCSK9 D374Y oscilaron entre 7,3 nM y 10,1 nM con un promedio (± SD) de 9,1 nM ± 1,5 nM (n=3). Los valores de IC₅₀ para 11F1 en el ensayo de PCSK9 natural oscilaron entre 4,4 nM y 8,1 nM con un promedio (± SD) de 5,9 nM ± 1,9 nM (n=3). Cabe destacar que estos valores de IC₅₀ dependen de la cantidad de PCSK9 D374Y recombinante o PCSK9 WT utilizado en el

ensayo de unión. En las figuras 32 y 33, respectivamente, se presenta una curva de respuesta a la dosis representativa para los ensayos de D374Y y natural.

Ejemplo 34

Eficacia de 11F1 para bloquear la absorción de LDL celular

5 11F1 bloquea la interacción entre PCSK9 y LDLR *in vitro* y puede impedir la reducción mediada por PCSK9 de la absorción de LDL en las células HepG2.

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

Se utilizó el software GraphPad Prism (Version 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, CA) para graficar el logaritmo de la concentración de anticuerpo contra RFU y para determinar los valores de EC₅₀ mediante regresión no lineal utilizando el programa de ajuste de curva de respuesta a la dosis sigmoidea (pendiente variable).

Este ejemplo muestra que 11F1 bloqueó la disminución de la absorción de LDL mediada por PCSK9 D374Y o PCSK9 WT en las células HepG2, de manera dependiente de la dosis. El añadido de PCSK9 D374Y purificado recombinante (2 μ g/mL) o PCSK9 WT (25 μ g/mL) a las células HepG2 redujo la absorción de BODIPY-LDL a entre el ~50 y el 60 % y

el ~40 % del nivel medido en las células sin tratamiento, respectivamente. Los anticuerpos restauraron la absorción de LDL de manera dependiente de la dosis al nivel observado en las células sin tratar. El valor de EC50 promedio ($\pm$ SD) para la capacidad de 11F1 de bloquear la disminución mediada por PCSK9 D374Y de la absorción de LDL fue $35,3 \pm 9,1$ nM ($n = 6$, figura 34). El valor de EC50 para la capacidad de 11F1 de bloquear la disminución mediada por PCSK9 WT de la absorción de LDL fue $124,2 \pm 28,5$ nM ($n = 3$, figura 35). Cabe destacar que estos valores de EC50 dependen de la cantidad de PCSK9 D374Y recombinante o PCSK9 WT utilizado en el ensayo de células. El valor de EC50 es inferior contra PCSK9 D374Y que PCSK9 WT debido a que se utilizó menos PCSK9 D374Y en el ensayo porque su afinidad de unión a LDLR es de 5 a 30 veces mayor que la de PCSK9 WT (Cunningham y col., 2007; Fisher y col., 2007; Kwon y col., 2008).

Los valores de EC50 informados aquí son representativos de los valores promedio derivados de 3 a 6 mediciones separadas para 11F1.

Ejemplo 35

Eficacia de 11F1 y 8A3 para bloquear la PCSK9 humana expresada a través de un virus asociado a adeno en un modelo de ratón

Una administración en bolo intravenosa única de los anticuerpos anti-PCSK9 11F1 o 8A3 produce una disminución significativa en el no-HDL-C y TC en suero en los ratones que expresan PCSK9 humana mediante AAV. Este ejemplo demuestra la eficacia de los anticuerpos anti-PCSK9 para bloquear la función de PCSK9 humana *in vivo*.

En resumen, se generaron 120 ratones C57BL/6 que expresan PCSK9 humana mediante infección con un virus asociado a adeno (AAV) modificado que codifica la PCSK9 humana, que produce niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad circulantes (LDL-C). Se realizó un análisis de colesterol en suero utilizando el analizador Cobas Integra 400 plus chemistry (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN). Se aleatorizaron los animales en grupos de tratamiento con niveles similares de no-HDL-C (LDL-C y VLDL-C), HDL-C y TC. El día de tratamiento 0 ($T=0$), se eutanizó un subconjunto de ratones y se recolectó suero para establecer los niveles de referencia de ese día. Al resto de los ratones, se les administró 11F1, 8A3 o anticuerpo de control IgG2 anti-hemocianina de lapa californiana (KLH) a 30 mg/kg a través de inyección en la vena de la cola. En los días de 1 a 5 después de la inyección, se sometieron a eutanasia subconjuntos de ratones y se recogió sangre completa de la vena cava y se dejó coagular durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación a 12.000 rpm con una centrífuga de mesa durante 10 minutos, se recolectó el suero. Se realizó un análisis de colesterol en suero utilizando el analizador Cobas Integra 400 plus chemistry.

Se determinaron las concentraciones de PCSK9 en suero utilizando un ensayo ELISA de "sándwich". Se recubrieron placas de 96 pocillos transparentes durante la noche con 2 µg/ml de anticuerpo anti-PCSK9 monoclonal (31H4) diluido en 1X PBS. Se lavaron completamente las placas con 1X PBS/0,05 % de tween y se bloquearon durante 2 horas con 3 % de BSA/1XPBS. Después del lavado, se incubaron las placas durante 2 horas con suero diluido en diluyentes de ensayo generales (Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN). Se evaluó la PCSK9 humana recombinante (1 ng/ml a 500 ng/ml) simultáneamente y se utilizó para generar una curva estándar en cada placa de ELISA. Se añadió un anticuerpo anti-PCSK9 biotinilado policlonal de conejo (D8773, Amgen Inc, CA) a 1 µg/ml (en 1 % de BSA/PBS), seguido de neutravidina-HRP a 200 ng/ml (en 1 % de BSA/PBS). Se detectó la PCSK9 unida mediante incubación con sustrato TMB. Se detuvo la reacción con añadido de HCl 1 N y se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro Spectra Plus 384 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA). Se utilizó la curva estándar (ajuste logístico de 4 parámetros) generada con PCSK9 humana recombinante para determinar la concentración correspondiente de PCSK9 en las muestras de suero.

Se determinaron las concentraciones de anticuerpo en suero utilizando un ensayo ELISA de "sándwich". Se utilizaron IgG antihumana de cabra de Fc policlonal y un reactivo policlonal de IgG antihumana de cabra de Fc γ marcado con HRP (de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA) como el anticuerpo de captura y de detección, respectivamente. Una solución de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) reaccionado con peróxido y en presencia de peroxidasa de rábano (HRP), creó una señal colorimétrica que fue proporcional a la cantidad del anticuerpo anti-PCSK9 respectivo al cual se unió el reactivo de captura. Se midió la intensidad del color (densidad óptica, OD) a 450 nm menos 650 nm utilizando un lector de microplacas (Spectra Max Plus 384). Se analizaron los datos utilizando el paquete de reducción de datos Watson versión 7.0.0.01 (Thermo Scientific, Waltham, MA) con una regresión logística (autocálculo) de curvas estándar preparada por separado. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para el ensayo fue ng/mL 34,4.

Cálculo de parámetros farmacocinéticos en ratones con AAV

Se realizó un análisis no compartimentalizado (NCA) sobre las concentraciones en suero utilizando los momentos nominales predeterminados para cada sujeto utilizando WinNonlin Enterprise, versión 5.1.1 (Pharsight, St. Louis, MO). Los datos para calcular las constantes de velocidad de eliminación terminal y las vidas medias se eligieron mediante inspección visual de los perfiles de concentración-tiempo. Los parámetros de NCA informados incluyen: vida media aparente ($t_{1/2}$), área bajo la curva de concentración en suero-tiempo

desde el tiempo cero hasta la última concentración medida (AUC0-t) y eliminación sérica aparente (CL0-t). Se determinó AUC0-t utilizando el método trapezoidal lineal logarítmico lineal y se calculó CL0-t mediante dosis/AUC0-t. Para los anticuerpos 11F1, 8A3 y 31H4. El análisis de solución de dosis posterior al estudio mostró que las dosis reales se encontraban dentro del 20 % del objetivo de 30 mg/kg. Sin embargo, para el control IgG2, el análisis mostró que la dosis real fue solamente el 40 % del objetivo previsto. Por lo tanto, se utilizó una dosis corregida de 12 mg/kg para el cálculo de CL0-t para el control IgG2. Se informaron los parámetros en tres cifras significativas, excepto para la vida media, que se informó en dos cifras significativas.

Análisis estadístico

10 Todos los resultados de colesterol se expresaron como el promedio $\pm$ error estándar del promedio. Todos los datos farmacocinéticos se expresaron como promedio $\pm$ desviación estándar. El valor de p de 0,05, determinado por ANOVA de 1 vía, se utilizó como umbral para determinar la significancia estadística entre los animales con anticuerpo de control IgG2 anti-KLH inyectado y aquellos que recibieron el anticuerpo anti-PCSK9 en el mismo momento.

15 Efecto de los anticuerpos Anti-PCSK9 sobre el no-HDL-C, HDL-C y TC en suero

Para establecer un valor de referencia, se eutanizó un subconjunto de ratones con expresión de PCSK9 humana antes de la inyección de los anticuerpos y se recogió sangre. Los niveles de no-HDL-C, HDL-C y TC en estos animales fueron 33 ± 4 , 117 ± 4 y 183 ± 9 mg/dL, respectivamente (promedio $\pm$ SEM). Los niveles de PCSK9 en animales sin tratamiento se determinaron como $4921 \text{ ng/mL} \pm 2044 \text{ ng/mL}$.

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

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

30 Farmacocinética

Con una dosis intravenosa de 30 mg/kg, 11F1 y 8A3 presentaron un comportamiento farmacocinético muy similar (figura 39). Para estas dos moléculas, las exposiciones AUC0-t, el CL0-t calculado y las vidas medias aparentes fueron equivalentes (tabla de la figura 40). El

anticuerpo de control IgG2 anti-KLH tuvo una exposición AUC0-t inesperadamente inferior que 11F1 y 8A3, pero esto es probable debido a que el anticuerpo se administró en una dosis inferior que la prevista (12 mg/kg frente a 30 mg/kg); el análisis de solución de dosis mostró una concentración de anticuerpo del 40 % del objetivo. El CL0-t del anticuerpo de control IgG2 anti-KLH fue similar al de 11F1 y 8A3, cuando se calculó utilizando la dosis corregida y la vida media aparente del anticuerpo de control IgG2 anti-KLH se calculó en >120 horas. Estos datos sugieren que los efectos del ligando de PCSK9 sobre la eliminación del anticuerpo son menos pronunciados para 11F1 y 8A3 cuando se comparan con otros anticuerpos dosificados en el modelo de AAV porque los valores de CL0-t de 11F1 y 8A3 son más similares al anticuerpo de control IgG2 anti-KLH.

Compendio

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

Ejemplo 36

Efecto de una dosis subcutánea única de 11F1, 21B12 y 8A3 sobre los lípidos en suero en los monos cynomolgus

La administración única SC de 11F1, 8A3 o 21B12 a monos cynomolgus produce la reducción considerable del LDL-C en suero y del TC. Este estudio demostró la capacidad de los anticuerpos anti-PCSK9 de bajar el colesterol en suero en los primates no humanos.

En resumen, se aclimataron monos cynomolgus machos sin tratamiento al ambiente durante al menos 2 semanas antes de la experimentación. Se aleatorizaron los animales en grupos de tratamiento según una preselección de los niveles de TC, HDL-C, LDL-C y triglicéridos en suero y el peso corporal. Después de 1 semana, los animales se sometieron a ayuno durante la noche y se les extrajo sangre de la vasculatura periférica (vena cefálica o safenosa), para medir los niveles de lípidos en suero de referencia en un momento designado T

= 0. A los animales se les inyectó SC anticuerpo de control IgG2 anti-KLH, 11F1, 21B12 o 8A3 (todos en NaOAc 10 mM pH 5,2, 9 % sucrosa) a 0,5 mg/kg (todos a 0,4 mL/kg de peso corporal). Se recogieron muestras de sangre en ayunas de los animales en momentos designados durante un período de 45 días.

5 Diseño experimental

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

10 En momentos específicos, se recolectó sangre de los animales en condiciones de ayuno durante la noche de la vasculatura periférica (vena cefálica o safenosa). Se dejó coagular la sangre completa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación a 3.000 rpm durante 20 minutos, se recolectó el suero. Se realizó un análisis de colesterol en suero directo utilizando el analizador Cobas Integra 400 (Roche Diagnostics Inc, Indianápolis, IN). Se determinaron los niveles de apolipoproteína B en suero en momentos específicos (día 0, 3, 6, 15, 24 y 33) mediante Anilytics, MD, con la siguiente metodología. Se utilizó una alícuota de 17 µL de la muestra (sin preparación) para el análisis con un analizador Hitachi 717 utilizando una curva estándar de 6 puntos. Si el valor inicial de la muestra es mayor que la linealidad de la curva estándar, se diluye la muestra y se repite con el resultado multiplicado por el factor de dilución adecuado. Los reactivos para el ensayo (kit de reactivos APO-B # 86071, conjunto de anticuerpos # 86060, conjunto de control # 86103) se obtuvieron de DiaSorin (Stillwater, MN).

20 Se determinaron las concentraciones de anticuerpos en suero utilizando un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con un intervalo de ensayo de 34,4 a 3000 ng/mL (34,4 ng/mL como el límite inferior de cuantificación [LLOQ]).

25 Se realizó un análisis no compartimentalizado (NCA) sobre las concentraciones en suero utilizando los momentos nominales predeterminados para cada sujeto que utilizó Watson® LIMS, versión 7.0.0.01 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Los datos para calcular las constantes de velocidad de eliminación terminal y las vidas medias se eligieron mediante inspección visual del perfil de concentración-tiempo y el mejor ajuste lineal (típicamente de 360 h hasta que las concentraciones de anticuerpo descendieron por debajo del límite inferior

de cuantificación). Los parámetros de NCA informados incluyen: vida media terminal ($t_{1/2,z}$), la concentración en suero máxima (C_{max}), área bajo la curva de concentración en suero-tiempo desde el tiempo cero hasta el infinito (AUC_{0-inf}) y eliminación sérica aparente (CL/F). Se calculó AUC_{0-inf} utilizando el método trapezoidal lineal logarítmico lineal. Se informaron todos los parámetros en tres cifras significativas, excepto para la vida media, que se informó en dos cifras significativas.

Análisis estadístico

Se ajustó un modelo estadístico que considera el valor de referencia como una covariable y el grupo de tratamiento como un efecto fijo a la respuesta transformada logarítmicamente en cada momento para LDL-C, HDL-C, TC y los triglicéridos. Se aplicó la corrección de comparación múltiple de Tukey para ajustar las comparaciones de pares en cada momento. Se evaluó la significancia estadística en $\alpha=0,05$ utilizando los valores de p ajustados.

Efecto de 11F1, 21B12 y 8A3 sobre el colesterol LDL en suero

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

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

Se observó una disminución máxima del TC para 11F1 9 días después de la inyección, con un 27 % de disminución del TC en comparación con los monos (animales de control) tratados con el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH. El TC volvió a niveles similares a los observados en los animales de control para el día 27. Se observó una disminución máxima del TC para 21B12 3 días después de la inyección, con una disminución del 20 % del TC en comparación con los animales de control. El TC volvió transitoriamente a niveles similares a los observados en los animales tratados con vehículo para el día 4, pero fueron significativamente inferiores entre los días 14 y 18, inclusive. Se observó una disminución máxima del TC para 8A3 9 días después de la inyección, con una disminución del 22% del TC en comparación con

los animales de control. El TC volvió a niveles similares a los observados en los animales de control para el día 30 (figura 42).

Efecto de 11F1, 21B12 y 8A3 sobre el colesterol HDL en suero y los triglicéridos

5 En promedio y en cada momento, los niveles de HDL-C o triglicéridos para los animales tratados con 11F1 o 8A3 no fueron significativamente diferentes (según un nivel de significancia alfa = 0,05) de los observados en los monos tratados con el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH. Sin embargo, 21B12 no indujo un cambio estadísticamente significativo en HDL-C en un único momento (día 18 después de la inyección) (figura 43 y figura 45).

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

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

15 Perfiles farmacocinéticos de 11F1, 21B12 y 8A3

En 748 se muestra una gráfica de resumen de los perfiles de concentración-tiempo promedio por tratamiento. En la tabla de la figura 47, se muestran los parámetros farmacocinéticos promedio calculados para los animales que reciben 11F1, 21B12, 8A3 y el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH.

20 La absorción de los anticuerpos en todos los grupos fue congruente y característica de la administración subcutánea de los anticuerpos. La conducta farmacocinética de 21B12 con respecto a CL/F, Cmax y AUC0-inf fue congruente con la observada en estudios anteriores en donde se administró 21B12 en la misma dosis. La farmacocinética de 11F1 y 8A3 difirió significativamente de 21B12, en donde se observó un CL/F más bajo (aproximadamente el 25 15 % de 21B12 CL/F) y se calcularon vidas medias más largas (aproximadamente 200 h en comparación con las 40 h para 21B12). Cabe destacar que las farmacocinéticas de 11F1 y 8A3 no se pudieron distinguir entre sí, ni con el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH. Estos datos sugieren que la eliminación de 11F1 y 8A3 se ve afectada en un grado mucho menor por la asociación con la diana de PCSK9 que 21B12, dado que 11F1 y 8A3 tienen el mismo perfil de 30 exposición que el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH sin afinidad para PCSK9.

Compendio de los resultados

Durante el transcurso del estudio de 45 días, se observó una disminución estadísticamente significativa del TC y del LDL-C en los animales que recibieron 11F1, 21B12 o 8A3 en comparación con el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH. 11F1 se asoció con una

disminución estadísticamente significativa del LDL-C (contra el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH) desde el día 2 hasta el día 24 inclusive. 21B12 demostró una disminución estadísticamente significativa del LDL-C (contra el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH) desde el día 1 hasta el día 4 inclusive. 8A3 demostró una disminución estadísticamente significativa del LDL-C (contra el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH) desde el día 1 hasta el día 24 inclusive. Los cambios en TC y en ApoB reflejaron los cambios observados en el LDL-C para todos los grupos. 11F1 logró una disminución máxima del LDL-C (contra el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH en el mismo momento) 9 días después de la inyección (-57 %). 21B12 logró una disminución máxima del LDL-C (contra el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH en el mismo momento) 3 días después de la inyección (-64 %). 8A3 logró una disminución máxima del LDL-C (contra el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH en el mismo momento) 4 días después de la inyección (-54 %). 21B12 bajó el HDL-C en un único momento, 18 días después de la inyección. No se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de HDL-C después de la administración de 11F1 o 8A3. No se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de triglicéridos después de la administración de 11F1, 21B12 u 8A3.

EJEMPLO 37

Un estudio de dos partes para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la eficacia de un anticuerpo Anti-PCSK9 humano sobre LDL-C en sujetos con hipercolesterolemia familiar homocigótica

Diseño del estudio: es un estudio de 2 partes. La parte A es un estudio piloto de etiqueta abierta, de rama única, multicéntrico. La parte B es un estudio doble ciego, aleatorizado, controlado por placebo, multicéntrico del anticuerpo humano 21B12, con inscripción expandida, pero de diseño idéntico a la parte A. Los criterios de inclusión/exclusión y el plan de evaluaciones serán los mismos para las partes A y B.

- Los criterios de inclusión comprenden:
- Hombres y mujeres $\geq 12 \leq 65$ años
 - Diagnóstico de hipercolesterolemia familiar homocigótica
 - Terapias de reducción de lípidos estables durante al menos 4 semanas
 - Colesterol LDL > 130 mg/dl (3,4 mmol/L)
 - Triglicéridos < 400 mg/dL (4,5 mmol/L)
 - Peso corporal > 40 kg o mayor en la selección.
- Los criterios de exclusión comprenden:
- Aféresis de LDL o plasma en las 8 semanas previas a la aleatorización
 - Clase III o IV de la New York Heart Failure Association (NYHA) o última fracción

de eyección del ventrículo izquierdo conocida < 30 %

- Infarto de miocardio, angina inestable, intervención coronaria percutánea (PCI), injerto de derivación de las arterias coronarias (CABG) o apoplejía en los 3 meses previos a la aleatorización

5

- Cirugía cardíaca planificada o revascularización
- Arritmia cardíaca no controlada
- Hipertensión no controlada

El plan de evaluaciones incluye, entre otros, recolección de datos sobre eventos adversos (AE) y eventos adversos significativos (SAE), signos vitales, medicamentos concomitantes, pruebas de laboratorio, etc.

10

Los sujetos que cumplan con los criterios de inclusión/exclusión deberán realizar una dieta de TLC del panel de tratamiento de adultos de NCEP (o similar) y se les solicitará que mantengan la terapia de reducción de lípidos actual durante los estudios.

La formulación de 21B12 será presentada como un líquido congelado, transparente, estéril, claro. Se llena cada frasco estéril con un volumen administrable de 1 mL de 21B12 70 mg/mL formulado con acetato de sodio 10 mM, 9 % (p/v) de sucrosa, 0,004 % (p/v) de polisorbato 20, pH 5,2. Cada frasco es para un solo uso. El placebo será presentado en recipientes idénticos como un líquido congelado, libre de proteínas, estéril, transparente, claro, formulado como acetato de sodio 10 mM, 9 % (p/v) de sucrosa, 0,004 % (p/v) de polisorbato 20, pH 5,2.

15

20

En la parte A, se inscribirán 4-16 sujetos que recibirán una formulación de 21B12 de etiqueta abierta (420 mg Q4W). Las visitas del estudio se realizarán cada 4 semanas. Estas visitas comprenderán la recolección de datos sobre eventos adversos (AE) y eventos adversos significativos (SAE), signos vitales, medicamentos concomitantes, pruebas de laboratorio, etc. Se recolectará un panel de lípidos en ayunas en la semana 6 para evaluar el nivel más bajo de LDL-C en respuesta al tratamiento con la formulación de 21B12. La formulación de 21B12 será administrada el día 1, en la semana 4 y en la semana 8. La visita de final del estudio (EOS) y el último cálculo de los lípidos será en la semana 12.

25

Aproximadamente 51 sujetos nuevos se inscribirán para la parte B. Los sujetos inscritos serán aleatorizados con una asignación de 2: 1 en 2 grupos de tratamiento: 420 mg de 21B12 Q4W SC o placebo Q4W SC. La aleatorización será estratificada según los niveles de LDL-C de referencia. Las visitas del estudio se realizarán cada 4 semanas, con dos visitas opcionales en la semana 2 y en la semana 10. Las visitas comprenderán la recolección de datos sobre AE y SAE, signos vitales, medicamentos concomitantes, pruebas de laboratorio,

30

etc. Se recolectará un panel de lípidos en ayunas en la semana 6 para evaluar el nivel más bajo de LDL-C en respuesta al tratamiento con 21B12. La formulación de 21B12 será administrada el día 1, en la semana 4 y en la semana 8. La visita de final del estudio (EOS) y el último cálculo de los lípidos será en la semana 12 para todos los sujetos.

5 Incorporación por referencia

Todas las referencias citadas aquí, incluidas las patentes, solicitudes de patentes, documentos, libros de texto y similares y las referencias citadas aquí, en la medida en que no se haya hecho aún, se incorporan al presente por referencia en su totalidad. Si alguna de las definiciones o términos proporcionados en las referencias incorporadas por referencia se contradice con los términos y el debate proporcionado aquí, los términos y las definiciones que
10 figuran en el presente prevalecerán.

Equivalentes

Se considera que la especificación escrita anteriormente es suficiente para permitirle la práctica de la invención a un entendido en la técnica. La descripción y los ejemplos anteriores describen determinadas realizaciones preferidas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Cabe destacar, sin embargo, que independientemente de lo
15 detallado que pueda parecer lo anterior en el texto, la invención se puede llevar a la práctica de muchas maneras y la invención se debe interpretar de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y con cualquier equivalente de estas.

20

REIVINDICACIONES SOLICITUD DIVISIONAL DEL EXPEDIENTE 13 286712

1. Una formulación estable que comprende al menos un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a PCSK9, en donde PCSK9 comprende los aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 1, el anticuerpo monoclonal en una cantidad de entre aproximadamente 40 mg/ml y aproximadamente 300 mg/ml, un tampón farmacéuticamente aceptable en una cantidad de entre aproximadamente 0,05 mM y aproximadamente 40 mM, un surfactante farmacéuticamente aceptable en una cantidad que es entre aproximadamente el 0,01 % p/v y aproximadamente el 20 % p/v, al menos un estabilizador farmacéuticamente aceptable de entre aproximadamente el 0,5 % p/v y aproximadamente el 10 % p/v, en donde la formulación estable tiene un pH de entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 6,0.
2. La formulación estable de la reivindicación 1, en la cual el anticuerpo monoclonal comprende:
- a) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEQ. ID. N.º: 12 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEQ. ID. N.º: 67,
 - b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEQ. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEQ. ID. N.º: 463,
 - c) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEQ. ID. N.º: 461 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEQ. ID. N.º: 459,
 - d) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEQ. ID. N.º: 485 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEQ. ID. N.º: 483; o
 - e) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEQ. ID. N.º: 582 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la de SEQ. ID. N.º: 583.

3. La formulación estable de la reivindicación 2, en la cual el anticuerpo monoclonal comprende:
- a) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 463,
 - b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 12 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 67,
 - c) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 461 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 459,
 - d) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 485 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 483 o
 - e) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 582 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 583.
4. La formulación estable de la reivindicación 2, en la cual el anticuerpo monoclonal se selecciona del grupo que consiste en 11F1, 31H4, 8A3 y 8A1.
5. La formulación estable de la reivindicación 2, en la cual el tampón farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en glutamato, fosfato, salina con tampón de fosfato, acetato sódico, citrato de sodio y tampón Tris.
6. La formulación estable de la reivindicación 5, en la cual dicho tampón farmacéuticamente aceptable es acetato de sodio.
7. La formulación estable de la reivindicación 6, en la cual el tampón farmacéuticamente aceptable está presente en una cantidad de 10-20 mM.
8. La formulación estable de la reivindicación 2, en la cual dicho surfactante farmacéuticamente aceptable es polisorbato 80 o polisorbato 20.
9. La formulación estable de la reivindicación 7, en la cual dicho surfactante farmacéuticamente aceptable es polisorbato 80.
10. La formulación estable de la reivindicación 7, en la cual dicho surfactante farmacéuticamente aceptable es polisorbato 20.
11. La formulación estable de cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 o 10, en la cual el surfactante farmacéuticamente aceptable está presente en una cantidad de entre

- aproximadamente el 0,004 % p/v y aproximadamente el 0,01 % p/v.
12. La formulación estable de cualquiera de la reivindicación 2, en la cual dicho estabilizador farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en un polihidroxi hidrocarburo, un disacárido, un poliol, prolina, arginina, lisina, metionina, taurina y alcohol bencílico.
13. La formulación estable de la reivindicación 12, en la cual dicho estabilizador es un polihidroxi hidrocarburo seleccionado del grupo que consiste en sorbitol, manitol y glicerol.
14. La formulación estable de la reivindicación 11, en la cual dicho estabilizador es sorbitol.
15. La formulación estable de la reivindicación 12, en la cual dicho estabilizador es un disacárido seleccionado del grupo que consiste en sucrosa, maltosa, lactosa, fructosa y trehalosa.
16. La formulación estable de la reivindicación 11, en la cual dicho estabilizador es sucrosa.
17. La formulación estable de la reivindicación 16, en la cual el estabilizador está presente en una cantidad de aproximadamente el 9 % p/v.
18. La formulación estable de la reivindicación 11, en la cual el estabilizador es prolina.
19. La formulación estable de la reivindicación 18, en la cual la prolina está presente en una cantidad de entre aproximadamente el 2 % y el 3 % p/v.
20. La formulación estable de la reivindicación 17, en la cual la formulación tiene un pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 5,5.
21. La formulación estable de la reivindicación 19, en la cual la formulación tiene un pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 5,5.
22. La formulación estable de la reivindicación 17, en la cual la formulación estable comprende una viscosidad de 30 cP o menos a 25 °C.
23. La formulación estable de la reivindicación 19, en la cual la formulación estable comprende una viscosidad de 30 cP o menos a 25 °C.
24. La formulación estable de la reivindicación 19, en la cual la cantidad de anticuerpo monoclonal es entre aproximadamente 70 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml y la formulación estable comprende una viscosidad de 12 cP o menos a 25 °C.
25. La formulación estable de la reivindicación 20 que comprende entre aproximadamente 250 mOsmol/kg y aproximadamente 350 mOsmol/kg.
26. La formulación estable de la reivindicación 21 que comprende entre aproximadamente 250 mOsmol/kg y aproximadamente 350 mOsmol/kg.
27. La formulación estable de la reivindicación 20, en la cual la formulación estable permanece estable durante al menos 3, 6, 12 o 24 meses.

28. La formulación estable de la reivindicación 21, en la cual la formulación estable permanece estable durante al menos 3, 6, 12 o 24 meses.
29. La formulación estable de la reivindicación 27, en la cual el anticuerpo monoclonal comprende una región variable de cadena ligera que es al menos el 90 % idéntica a la de la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 465 y una a región variable de cadena pesada que es al menos el 90 % idéntica a la de la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 463.
30. La formulación estable de la reivindicación 28, en la cual el anticuerpo monoclonal comprende una región variable de cadena ligera que es al menos el 90 % idéntica a la de la
10 secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 465 y una a región variable de cadena pesada que es al menos el 90 % idéntica a la de la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 463.
31. La formulación estable de la reivindicación 27, en la cual el anticuerpo monoclonal comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 463 y en donde la cantidad de anticuerpo monoclonal es
15 aproximadamente 150 mg/ml.
32. La formulación estable de la reivindicación 28, en la cual el anticuerpo monoclonal comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 465 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 463 y en donde la cantidad de anticuerpo monoclonal es
20 aproximadamente 150 mg/ml.
33. Una formulación estable que comprende
- a. un anticuerpo monoclonal en una cantidad de entre aproximadamente 70 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml, dicho anticuerpo monoclonal comprende:
- i) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de
25 aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEQ. ID. N.º: 577 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEQ. ID. N.º: 576;
- ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de
30 aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 577 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 576;
- iii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEQ. ID. N.º: 588 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEQ. ID. N.º: 599; o

iv) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 588 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 589;

(b) aproximadamente 10 mM de acetato de sodio;

(c) aproximadamente el 9,0 % p/v de sucrosa;

(d) entre aproximadamente el 0,004 % y aproximadamente el 0,01 % p/v de polisorbato 20 o polisorbato 80 y

(e) un pH de aproximadamente 5,2.

34. Una formulación estable que comprende: un anticuerpo monoclonal en una cantidad de entre aproximadamente 70 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml, dicho anticuerpo monoclonal comprende:

i) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEQ. ID. N.º: 577 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEQ. ID. N.º: 576;

ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 577 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 576;

iii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEQ. ID. N.º: 588 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 90 % con la secuencia de SEQ. ID. N.º: 589; o

iv) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 588 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID. N.º: 589,

(b) aproximadamente 10 mM de acetato de sodio;

(c) entre aproximadamente el 2,0 % y el 3,0 % p/v de prolina;

(d) aproximadamente el 0,01 % p/v de polisorbato 20 o polisorbato 80 y

(e) un pH de aproximadamente 5,0.

RESUMEN

La presente invención se refiere a métodos para tratar o prevenir trastornos relacionados con el colesterol, por ejemplo hipercolesterolemia, hiperlipidemia o dislipidemia, que utilizan anticuerpos contra la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9).

- 5 También se describen formulaciones y los métodos para producir dichas formulaciones.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0067756

Bogotá D.C., Junio 16 de 2015 - 14:46:55

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	673676496	16/06/2015	2.138.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01	SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	478.000.00	478.000.00
				\$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-286712-00006-0000

Fecha: 2015-06-16 15:25:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 851 DIVISIONAL Folios: 230

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-137634-00000-0000

Fecha: 2015-06-16 15:25:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 230

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

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

Junio 16 de 2015 - 14:46:57

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0067757

Bogotá D.C., Junio 16 de 2015 - 14:46:55

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	673676496	16/06/2015	2.138.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
24 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	768.000.00
				\$768.000.00

SON: **SETECIENTOS SESENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-286712-00006-0000

Fecha: 2015-06-16 15:25:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 230

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-137634-00000-0000

Fecha: 2015-06-16 15:25:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 230

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

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

Junio 16 de 2015 - 14:46:57