



Organizacion CSA Ltda

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

09-112535

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: MOLÉCULAS Y MÉTODOS PARA MODULAR LA PRO-PROTEÍNA
CONVERTASA-SUBTILISINA/QUENAXINA TIPO 9 (PCSK9)

SOLICITANTE: NOVARTIS AG

DIRECCIÓN: Lichtstrasse 35, CH- 4056 Basel, Suiza

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 09 Octubre de 2009

P2009/000167

Cons. No pag. 1009
Fol. 13-11-2009

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-112535-00000-0000

Fecha: 2009-10-09 16:42:06 Dep: 2020 NUECREACION
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 280

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000167

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: NOVARTIS AG

Dirección: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel

Nacionalidad o Domicilio: Suiza

Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono: _____ **Fax:** _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: 1) Dmitri MIKHAILOV; 2) David Langdon YOWE;
3) Tony FLEMING

Dirección: 1) 305G Winchester Street, Newton, Massachusetts 02461
E.U.A.; 2) 34 Fairview Avenue, Belmont, Massachusetts 02478 E.U.A 3) 152
Hudson Road, Stow, Massachusetts E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidenses

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/054417 Fecha Abril 11, 2008

Publicación Internacional No. WO 2008/125623 Fecha Octubre 23, 2008

6

Título (54) MOLÉCULAS Y MÉTODOS PARA MODULAR LA PRO-PROTEÍNA
CONVERTASA-SUBTILISINA/QUEXINA TIPO 9 (PCSK9)

Clasificación Internacional (51) C07K 16/40, C12N/64

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Abril 13, 2007

(31) Número de
Solicitud

60/911,654

9

Comprobante de pago No. 09-

Fecha Octubre 9 de 2009

10

ANEXOS☒

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

☒

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

☒

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 08-066177

☐

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

☐

Declaraciones.

☒

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

☒

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

☐

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

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

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

☐

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

☐

Arte final 12 x 12.

☐

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

☐

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

☒

Otros. Búsqueda Internacional.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 76,118
FECHA : OCTUBRE 8 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-112535-00000-0000

Fecha: 2009-10-09 16:42:06 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 280

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	130889730	08/10/2009	4,964,000.00

***** CONCEPTO *****

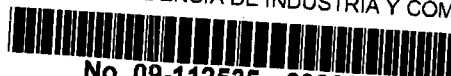
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-112535-00000-0000

Fecha: 2009-10-09 16:42:06 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 280

Nota del traductor:

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

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

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


Traductor Ofi
JORGE E. SIERRA
Licencia 376 - 1993

J

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

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

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

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

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

Mi licencia vence el 11 de Marzo de 2009.

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


Traductor Ofi
JORGE E. SIERRA
Licencia 376 - 1993

6

Certificación:

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

Fecha: 12 de Septiembre de 2006.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

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

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

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

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

Traductor Ofi
JORGE E. SIERRA
Licencia 376 - 1993

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

Carlos R. O.
J. Ian Raisb
Ana María F
Juan Guillermo M
Natalia Ca

Zayde Ch.
Jacqueline Chap
José Luis Lond
Felipe Menc
Simón Sal

OF Cou
Guillermo Chr
Graciela M

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

El suscrito,

NOVARTIS AG

domiciliado en

Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel / Switzerland

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

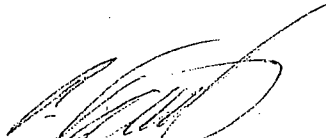
por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

Date/Fecha: June 27, 2006

City/Country/Ciudad,País: Basel, Switzerland


Arthur Canonica


Pascal Traub

8

Attestation

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

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

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

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



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

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

Leg.Prot.Nr. 975 /2006

9

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by *H. Fischer*

3. in his/her function as *Off. Verw.*

4. and certified by the seal of the *Verwaltung*

Certified 20. Aug. 2006

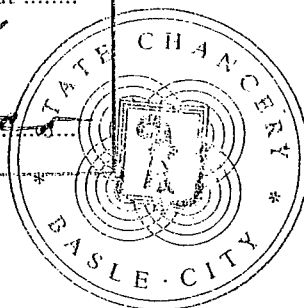
5. in Basel (Bâle) 6. on

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

8. no. *10491 18.584*

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

Heidi Fischer



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 October 2008 (23.10.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/125623 A2

- (51) International Patent Classification:
C07K 16/40 (2006.01) C12N 9/64 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/EP2008/054417
- (22) International Filing Date: 11 April 2008 (11.04.2008)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/911,654 13 April 2007 (13.04.2007) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **MIKHAILOV, Dmitri** [US/US]; 305G Winchester Street, Newton, Massachusetts 02461 (US). **YOWE, David Langdon** [US/US]; 34 Fairview Avenue, Belmont, Massachusetts 02478 (US). **FLEMING, Tony** [US/US]; 152 Hudson Road, Stow, Massachusetts 01775 (US).
- (74) Agent: **VOEGELI-LANGE, Regina**; Novartis Pharma AG, Patent Department, CH-4002 Basel (CH).

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

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

Declaration under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

WO 2008/125623 A2

(54) Title: MOLECULES AND METHODS FOR MODULATING PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXIN TYPE 9 (PCSK9)

(57) Abstract: Epitopes of Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), compositions that bind to PCSK9 and PCSK9 epitopes, and methods of using the compositions are described herein.

MOLECULES AND METHODS FOR MODULATING PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXIN TYPE 9 (PCSK9)

TECHNICAL FIELD

This invention relates to antigen binding molecules, epitopes bound by those molecules, and methods of using the molecules.

BACKGROUND

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) (also known as Neural apoptosis-regulated convertase 1, or NARC-1) is a member of the proteinase K secretory subtilisin-like subfamily of serine proteases (Naureckiene et al., 2003 Arc. Biochem. Biophys. 420:55-67). Human PCSK9 is a secreted protein expressed primarily in the kidneys, liver and intestines. It has a three domains: an inhibitory pro-domain (amino acids 1-152; including a signal sequence at amino acids 1-30), a serine protease domain (amino acids 153-448), and a C-terminal domain 210 residues in length (amino acids 449-692), which is rich in cysteine residues. PCSK9 is synthesized as a zymogen that undergoes autocatalytic cleavage between the pro-domain and catalytic domain in the endoplasmic reticulum. The pro-domain remains bound to the mature protein after cleavage, and the complex is secreted. The cysteine-rich domain may play a role analogous to the P-(processing) domains of other Furin/Kexin/Subtilisin-like serine proteases, which appear to be essential for folding and regulation of the activated protease. Mutations in PCSK9 are associated with abnormal levels of low density lipoprotein cholesterol (LDL-c) in the blood plasma (Horton et al., 2006 Trends. Biochem. Sci. 32(2):71-77).

SUMMARY

The present invention relates to epitopes of PCSK9, PCSK9 binding molecules, and methods of using the molecules. PCSK9 binding molecules interact with PCSK9 and modulate PCSK9 functions. PCSK9 binding molecules can be used to increase LDL-receptor (LDL-R) levels and reduce cholesterol levels.

In various aspects, the invention provides PCSK9 binding molecules that modulate (e.g., inhibit) one or more biological functions of PCSK9. For example, a PCSK9 binding molecule can inhibit proteolytic activity of PCSK9 (e.g., proteolysis of the PCSK9 pro-domain) and/or an interaction between PCSK9 and a PCSK9

12

30 receptor (e.g., PCSK9 binding to LDL-R). PCSK9 downregulates LDL-R in a post-
31 transcriptional manner. Thus, inhibition of PCSK9 results in increased LDL-R levels.
32 Increased levels of LDL-R in vivo allows for increased LDL-R mediated uptake of
33 LDL-c. Thus, binding molecules that interfere with PCSK9 regulation of LDL-R
34 ultimately reduce levels of circulating LDL-c.

35 PCSK9 binding molecules include, for example, antibodies that bind to
36 PCSK9 (e.g., within a particular domain or epitope of PCSK9, such as the catalytic
37 domain or the cysteine-rich domain), and polypeptides that include antigen binding
38 portions of such antibodies. PCSK9 binding molecules also include molecules in
39 which the binding portion is not derived from an antibody, e.g., PCSK9 binding
40 molecules derived from polypeptides that have an immunoglobulin-like fold, and in
41 which the antigen binding portion is engineered to bind PCSK9 through
42 randomization, selection, and affinity maturation.

43 Accordingly, in one aspect, the invention features a PCSK9 binding molecule
44 including an antigen binding portion of an antibody that binds (e.g., specifically
45 binds) to a PCSK9, wherein the antigen binding portion binds to an epitope within the
46 catalytic domain of human PCSK9 (SEQ ID NO:1) within or overlapping (e.g.,
47 comprising or consisting of all or a portion) one of the following: (a) amino acids
48 166-177 of SEQ ID NO:1 (i.e., an epitope within or overlapping the following
49 sequence: YRADEYQPPDGG (SEQ ID NO:4));(b) amino acids 187-202 of SEQ ID
50 NO:1 (i.e., an epitope within or overlapping the following sequence:
51 TSIQSDHREIEGRVMV (SEQ ID NO:5)); (c) amino acids 206-219 of SEQ ID NO:1
52 (i.e., an epitope within or overlapping the following sequence: ENVPEEDGTRFHRQ
53 (SEQ ID NO:6)); (d) amino acids 231-246 of SEQ ID NO:1 (i.e., an epitope within or
54 overlapping the following sequence: AGVVSGRDAGVAKGAS (SEQ ID
55 NO:7));(e) amino acids 277-283 of SEQ ID NO:1 (i.e., an epitope within or
56 overlapping the following sequence: VQPVGPL (SEQ ID NO:8)); (f) amino acids
57 336-349 of SEQ ID NO:1 (i.e., an epitope within or overlapping the following
58 sequence: VGATNAQDQPVTLG (SEQ ID NO:9)); (g) amino acids 368-383 of SEQ
59 ID NO:1 (i.e., an epitope within or overlapping the following sequence:
60 IIGASSDCSTCFVSQS (SEQ ID NO:10)); or (h) amino acids 426-439 of SEQ ID
61 NO:1 (i.e., an epitope within or overlapping the following sequence:
62 EAWFPEDQRVLTPN (SEQ ID NO:11)).

13

63 For example, the antigen binding portion binds to an epitope within amino
64 acids 166-171, 169-174, or 172-177 of SEQ ID NO:1; the antigen binding portion
65 binds to an epitope within amino acids 187-193, 191-196, 194-199, or 197-202 of
66 SEQ ID NO:1; the antigen binding portion binds to an epitope within amino acids
67 206-211, 209-214, 212-217, 215-219 of SEQ ID NO:1; the antigen binding portion
68 binds to an epitope within amino acids 231-237, 235-240, 238-243, 241-246 of SEQ
69 ID NO:1; the antigen binding portion binds to an epitope within amino acids 277-282,
70 or 279-283 of SEQ ID NO:1; the antigen binding portion binds to an epitope within
71 amino acids 336-341, 339-343, 341-346, or 344-349 of SEQ ID NO:1; the antigen
72 binding portion binds to an epitope within amino acids 368-374, 372-377, 375-380, or
73 378-383 of SEQ ID NO:1; the antigen binding portion binds to an epitope within
74 amino acids 426-431, 429-434, 432-437, or 435-439 of SEQ ID NO:1).

75 In another aspect, the invention features an isolated PCSK9 binding molecule
76 comprising an antigen binding portion of an antibody that binds (e.g., specifically
77 binds) to a PCSK9, wherein the antigen binding portion binds to an epitope within the
78 cysteine-rich domain of human PCSK9 within or overlapping one of the following:
79 (a) amino acids 443-500 of SEQ ID NO: 1; (b) amino acids 557-590; or (c) amino
80 acids 636-678.

81 In various embodiments, the antigen binding portion specifically binds to an
82 epitope of human PCSK9 within or overlapping within or overlapping one of the
83 following: (a) amino acids 443-458 of SEQ ID NO:1 (i.e., an epitope within or
84 overlapping the following sequence: ALPPSTHGAGWQLFCR (SEQ ID NO:12)); (b)
85 amino acids 459-476 of SEQ ID NO:1 (i.e., an epitope within or overlapping the
86 following sequence: TVWSAHSGPTRMATAIAR (SEQ ID NO:13)); (c) amino acids
87 486-500 of SEQ ID NO:1 (i.e., an epitope within or overlapping the following
88 sequence: CSSFSRSGKRRGERM (SEQ ID NO:14)); (d) amino acids 557-573 of
89 SEQ ID NO:1 (i.e., an epitope within or overlapping the following sequence:
90 HVLTCSSHWEDLGT (SEQ ID NO:15)); (e) amino acids 577-590 of SEQ ID
91 NO:1 (i.e., an epitope within or overlapping the following sequence:
92 PVLPRGQPNQCVG (SEQ ID NO:16)); (f) amino acids 636-645 of SEQ ID NO:1
93 (i.e., an epitope within or overlapping the following sequence: SALPGTSHVL (SEQ
94 ID NO:17)); (g) amino acids 659-677 of SEQ ID NO:1 (i.e., an epitope within or

14

95 overlapping the following sequence: RDVSTTGSTSEEAVTAVAI (SEQ ID
96 NO:18));

97 For example, the antigen binding portion binds to an epitope within amino
98 acids 443-449, 447-452, 450-455, 453-458 of SEQ ID NO:1; the antigen binding
99 portion binds to an epitope within amino acids 459-465, 463-468, 466-471, 469-474,
100 or 472-476 of SEQ ID NO:1; the antigen binding portion binds to an epitope within
101 amino acids 486-491, 489-494, 492-497, or 495-500 of SEQ ID NO:1; the antigen
102 binding portion binds to an epitope within amino acids 557-563, 561-566, 564-569,
103 567-572, or 569-573 of SEQ ID NO:1; the antigen binding portion binds to an epitope
104 within amino acids 577-582, 580-585, 583-588, or 586-590 of SEQ ID NO:1; the
105 antigen binding portion binds to an epitope within amino acids 636-643, or 640-645
106 of SEQ ID NO:1; the antigen binding portion binds to an epitope within amino acids
107 659-665, 663-668, 665-670, 668-673, or 671-677 of SEQ ID NO:1.

108 In another aspect, the invention features an isolated PCSK9 binding molecule
109 including an antigen binding portion of an antibody that binds (e.g., specifically
110 binds) to a PCSK9, wherein the antigen binding portion binds to an epitope within the
111 pro-domain of human PCSK9 within or overlapping amino acids 89-134 of SEQ ID
112 NO:1.

113 In various embodiments, the antigen binding portion specifically binds to an
114 epitope of human PCSK9 within or overlapping one of the following: (a) amino acids
115 89-101 of SEQ ID NO:1 (i.e., an epitope within or overlapping the following
116 sequence: SQSERTARRLQAQ (SEQ ID NO:2)); or (b) amino acids 106-134 of SEQ
117 ID NO:1 (i.e., an epitope within or overlapping the following sequence:
118 GYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELA (SEQ ID NO:3)). For example, the
119 antigen binding portion specifically binds to an epitope within amino acids 123-131 of
120 SEQ ID NO:1.

121 For example, the antigen binding portion binds to an epitope within amino
122 acids 89-94, 92-97, or 95-101 of SEQ ID NO:1; the antigen binding portion binds to
123 an epitope within amino acids 106-111, 109-114, 112-117, 115-120, 118-123, 121-
124 126, 124-129, or 127-134 of SEQ ID NO:1.

125 In a particular embodiment, the antigen binding portion specifically binds to
126 an epitope within the pro-domain of human PCSK9 within or overlapping amino acids
127 101-107 of SEQ ID NO:1 (amino acids QAARRGY).

128 In another embodiment, the antigen binding portion specifically binds to an
129 epitope within the pro-domain of human PCSK9 within or overlapping amino acids
130 123-132 of SEQ ID NO:1 (amino acids LVKMSGDLLE). These amino acids fall
131 within amino acids 106-134 of the pro-domain of PCSK9 (SEQ ID NO:3;
132 GYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELA).

133 In another embodiment, the antigen binding portion specifically binds to
134 PCSK9 with amino acids 101-132 of SEQ ID NO:1 (i.e., binds to an epitope within
135 SEQ ID NO:2, an epitope within SEQ ID NO:3, or an epitope that overlaps SEQ ID
136 NOs: 2 and 3, i.e., includes at least one amino acid from SEQ ID NO:2 and SEQ ID
137 NO:3).

138 In another embodiment, the antigen binding portion specifically binds to
139 PCSK9 within amino acids 101-132 of SEQ ID NO:1 and comprises at least one
140 amino acid from SEQ ID NO:2 (e.g., glutamine) and at least one amino acid from
141 SEQ ID NO:3 (e.g., glycine and/or tyrosine).

142 In another embodiment, the antigen binding portion specifically binds to
143 PCSK9 within amino acids 101-132 of SEQ ID NO:1 and comprises at least one
144 amino acid from SEQ ID NO:2 (e.g., glutamine) and at least one amino acid from
145 SEQ ID NO:3 (e.g., glycine and/or tyrosine).

146 In another embodiment, the antigen binding portion specifically binds to
147 PCSK9 at an epitope that overlaps at least one amino acid from SEQ ID NO:2 (e.g.,
148 glutamine) and at least one amino acid from SEQ ID NO:3 (e.g., glycine and/or
149 tyrosine).

150 In another aspect, the invention features an isolated PCSK9 binding molecule
151 that cross-competes for binding with any of the aforementioned PCSK9 binding
152 molecules. Accordingly, such cross-competing binding molecules can, for example,
153 interfere with binding (e.g., of an antibody or other PCSK9 binding molecule
154 comprising an antigen binding portion of an antibody that binds) to amino acids 101-
155 107 or 123-132 of SEQ ID NO:1 by binding to spatially proximate epitopes.

156 In various embodiments, the PCSK9 binding molecule (e.g., the PCSK9
157 binding molecule that binds to an epitope within the catalytic domain, within the
158 cysteine-rich domain, or within the pro-domain) is cross reactive with a PCSK9 of a
159 non-human primate (e.g., a cynomolgus monkey, or a rhesus monkey). In various

160 embodiments, the antigen binding portion is cross reactive with a PCSK9 of a rodent
161 species (e.g., murine PCSK9, rat PCSK9).

162 In various embodiments, the antigen binding portion binds to a linear epitope.

163 In various embodiments, the antigen binding portion binds to a non-linear
164 epitope. In one example, the antigen binding portion binds to a non-linear epitope
165 including, or consisting of, at least one portion of each of the following linear
166 epitopes: (a) amino acids 89-101 of SEQ ID NO:1; and (b) amino acids 106-134 of
167 SEQ ID NO:1. In another example, the antigen binding portion binds to a non-linear
168 epitope including, or consisting of, at least one portion of each of the following linear
169 epitopes: (a) amino acids 166-177 of SEQ ID NO:1; and (b) amino acids 443-458 of
170 SEQ ID NO:1. In yet another example, the antigen binding portion binds to a non-
171 linear epitope including, or consisting of, at least one portion of two or three of the
172 following linear epitopes: (a) amino acids 187-202 of SEQ ID NO:1; (b) amino acids
173 231-246 of SEQ ID NO:1; and (c) amino acids 368-383 of SEQ ID NO:1. In another
174 example, the antigen binding portion binds to a non-linear epitope including, or
175 consisting of, at least one portion of each of the following linear epitopes: (a) amino
176 acids 206-219 of SEQ ID NO:1; and (b) amino acids 277-283 of SEQ ID NO:1. In
177 another example, the antigen binding portion binds to a non-linear epitope including,
178 or consisting of, at least one portion of each of the following linear epitopes: (a)
179 amino acids 336-349 of SEQ ID NO:1; and (b) amino acids 426-439 of SEQ ID
180 NO:1. In another example, the antigen binding portion binds to a non-linear epitope
181 including, or consisting of, at least one portion of two or three of the following linear
182 epitopes: (a) amino acids 459-476 of SEQ ID NO:1; (b) amino acids 486-500 of SEQ
183 ID NO:1; and (c) amino acids 557-573 of SEQ ID NO:1. In another example, the
184 antigen binding portion binds to a non-linear epitope including, or consisting of, at
185 least one portion of two or three of the following linear epitopes: (a) amino acids 577-
186 590 of SEQ ID NO:1; (b) amino acids 636-645 of SEQ ID NO:1; and (c) amino acids
187 659-677 of SEQ ID NO:1.

188 In a particular embodiment, the antigen binding portion binds to a non-linear
189 epitope (e.g., a conformational epitope) comprising all or a portion of (a) amino acids
190 101-107 of SEQ ID NO:1; and (b) amino acids 123-132 of SEQ ID NO:1.

17

191 In various embodiments, the efficacy of binding of the PCSK9 binding
192 molecules correlates to the location of binding within a particular domain or epitope
193 of PCSK9.

194 In various embodiments, the antigen binding portion of the PCSK9 binding
195 molecule binds to PCSK9 with a dissociation constant (K_D) equal to or less than
196 10 nM, 1 nM, 0.5 nM, 0.25 nM, or 0.1 nM.

197 In various embodiments, the antigen binding portion of the PCSK9 binding
198 molecule binds to PCSK9 of a non-human primate (e.g., cynomolgus monkey or
199 chimpanzee) with a K_D equal to or less than 0.3 nM.

200 In various embodiments, antigen binding portion binds to mouse PCSK9 with
201 a K_D equal to or less than 0.5 nM.

202 The antibody can be a chimeric (e.g., humanized) antibody or a human
203 antibody, or a humanized antibody.

204 In one embodiment, the antigen binding portion is an antigen binding portion
205 of a human antibody.

206 The antigen binding portion can be an antigen binding portion of a monoclonal
207 antibody or a polyclonal antibody.

208 The PCSK9 binding molecule includes, for example, an Fab fragment, an Fab'
209 fragment, an $F(ab')_2$, or an Fv fragment of the antibody.

210 In one embodiment, the PCSK9 binding molecule is a human antibody.

211 In one embodiment, the PCSK9 binding molecule includes a single chain Fv.

212 In one embodiment, the PCSK9 binding molecule includes a diabody (e.g., a
213 single chain diabody, or a diabody having two polypeptide chains).

214 In some embodiments, the antigen binding portion of the antibody is derived
215 from an antibody of one of the following isotypes: IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4. In
216 some embodiments, the antigen binding portion of the antibody is derived from an
217 antibody of an IgA or IgE isotype.

218 The PCSK9 binding molecule (e.g., the PCSK9 binding molecule that binds to
219 an epitope within the catalytic domain, within the cysteine-rich domain, or within the
220 pro-domain) can exhibit one or more of a number of biological activities. In various
221 embodiments, the PCSK9 binding molecule inhibits PCSK9 binding to a PCSK9
222 ligand. In some embodiments, the PCSK9 binding molecule inhibits binding to the
223 PCSK9 ligand at pH 7-8. In some embodiments, the PCSK9 binding molecule

224 inhibits binding at a pH below pH 7 (e.g., at pH 5-7). For example, the PCSK9
225 binding molecule inhibits PCSK9 binding to the PCSK9 ligand by at least 5%, 10%,
226 15%, 25%, or 50%, relative to a control (e.g., relative to binding in the absence of the
227 PCSK9 binding molecule).

228 For example, the PCSK9 binding molecule can inhibit PCSK9 binding to a
229 low density lipoprotein receptor (LDL-R)(e.g., the PCSK9 binding molecule inhibits
230 PCSK9 binding to LDL-R at pH 7 and lower pH, e.g., pH 5-7).

231 The PCSK9 pro-domain is cleaved from, and remains non-covalently
232 associated with, the mature PCSK9 polypeptide. In one embodiment, a PCSK9
233 binding molecule competes with a PCSK9 pro-domain for binding to the catalytic or
234 cysteine-rich domain (or vice versa), and inhibits a biological activity of PCSK9.

235 In some embodiments, the PCSK9 binding molecule inhibits proteolytic
236 activity of PCSK9 (e.g., proteolysis of the PCSK9 pro-domain, or of another PCSK9
237 substrate). For example, the PCSK9 binding molecule inhibits PCSK9 proteolytic
238 activity by at least 5%, 10%, 15%, 25%, or 50%, relative to a control (e.g., relative to
239 activity in the absence of the PCSK9 binding molecule).

240 In some embodiments, the PCSK9 binding molecule inhibits a PCSK9-
241 dependent decrease of LDL-R (e.g., PCSK9 dependent degradation of LDL-R) on a
242 cell, e.g., a hepatocyte. For example, the PCSK9 binding molecule inhibits a PCSK9-
243 dependent decrease of LDL-R by at least 5%, 10%, 15%, 25%, or 50%, relative to a
244 control (e.g., relative to the decrease of LDL-R in the absence of the PCSK9 binding
245 molecule). In these embodiments, an increase in LDL-R levels indicates that the
246 PCSK9 binding molecule inhibits the PCSK9-dependent decrease of LDL-R.

247 In certain embodiments, a PCSK9 binding molecule, when contacted with a
248 cell, e.g., a hepatocyte under conditions in which PCSK9 is present, increases LDL-c
249 uptake by the hepatocyte, relative to LDL-c uptake by a hepatocyte in the absence of
250 the PCSK9 binding molecule. For example, the PCSK9 binding molecule increases
251 LDL-c uptake by at least 5%, 10%, 15%, 25%, or 50%, relative to a control (e.g.,
252 relative to binding in the absence of the PCSK9 binding molecule).

253 The PCSK9 binding molecule can bind to PCSK9 in the presence of LDL-c
254 and/or it can bind to PCSK9 in the presence of serum (e.g., in the presence of at least
255 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, serum).

256 The invention also features non-antibody PCSK9 binding molecules. A non-
257 antibody PCSK9 binding molecule includes a PCSK9 binding domain that has an
258 amino acid sequence derived from an immunoglobulin-like (Ig-like) fold of a non-
259 antibody polypeptide, such as one of the following: tenascin, N-cadherin, E-cadherin,
260 ICAM, titin, GCSF-receptor, cytokine receptor, glycosidase inhibitor, antibiotic
261 chromoprotein, myelin membrane adhesion molecule P0, CD8, CD4, CD2, class I
262 MHC, T-cell antigen receptor, CD1, C2 and I-set domains of VCAM-1, I-set
263 immunoglobulin domain of myosin-binding protein C, I-set immunoglobulin domain
264 of myosin-binding protein H, I-set immunoglobulin domain of telokin, NCAM,
265 twitchin, neuroglian, growth hormone receptor, erythropoietin receptor, prolactin
266 receptor, interferon-gamma receptor, β -galactosidase/glucuronidase, β -glucuronidase,
267 transglutaminase, T-cell antigen receptor, superoxide dismutase, tissue factor domain,
268 cytochrome F, green fluorescent protein, GroEL, or thaumatin. In general, the amino
269 acid sequence of the PCSK9 binding domain is altered, relative to the amino acid
270 sequence of the immunoglobulin-like fold, such that the PCSK9 binding domain
271 specifically binds to the PCSK9 (i.e., wherein the immunoglobulin-like fold does not
272 specifically bind to the PCSK9).

273 In various embodiments, the amino acid sequence of the PCSK9 binding
274 domain is at least 60% identical (e.g., at least 65%, 75%, 80%, 85%, or 90% identical)
275 to an amino acid sequence of an immunoglobulin-like fold of a fibronectin, a cytokine
276 receptor, or a cadherin.

277 In various embodiments, the amino acid sequence of the PCSK9 binding
278 domain is at least 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, or 90% identical to an amino acid
279 sequence of an immunoglobulin-like fold of one of the following: tenascin, N-
280 cadherin, E-cadherin, ICAM, titin, GCSF-receptor, cytokine receptor, glycosidase
281 inhibitor, antibiotic chromoprotein, myelin membrane adhesion molecule P0, CD8,
282 CD4, CD2, class I MHC, T-cell antigen receptor, CD1, C2 and I-set domains of
283 VCAM-1, I-set immunoglobulin domain of myosin-binding protein C, I-set
284 immunoglobulin domain of myosin-binding protein H, I-set immunoglobulin domain
285 of telokin, NCAM, twitchin, neuroglian, growth hormone receptor, erythropoietin
286 receptor, prolactin receptor, interferon-gamma receptor, β -
287 galactosidase/glucuronidase, β -glucuronidase, transglutaminase, T-cell antigen

288 receptor, superoxide dismutase, tissue factor domain, cytochrome F, green fluorescent
289 protein, GroEL, or thaumatin.

290 In various embodiments, the PCSK9 binding domain binds to the PCSK9
291 with a K_D equal to or less than 10 nM (e.g., 1 nM, 0.5 nM, 0.1 nM).

292 In some embodiments, the Ig-like fold is an Ig-like fold of a fibronectin, e.g.,
293 an Ig-like fold of fibronectin type III (e.g., an Ig-like fold of module 10 of fibronectin
294 III).

295 The invention also provides peptides corresponding to antigenic epitopes of
296 PCSK9. In one aspect, the invention features a peptide consisting of an amino acid
297 sequence at least 90% identical to one of following amino acid sequences:
298 YRADEYQPPDGG (SEQ ID NO:4); TSIQSDHREIEGRVMV (SEQ ID NO:5);
299 ENVPEEDGTRFHRQ (SEQ ID NO:6); AGVVSGRDAGVAKGAS (SEQ ID NO:7);
300 VQPVGPL (SEQ ID NO:8); VGATNAQDQPVTLG (SEQ ID NO:9);
301 IIGASSDCSTCFVSQS (SEQ ID NO:10); EAWFPEDQRVLTNP (SEQ ID NO:11);
302 ALPPSTHGAGWQLFCR (SEQ ID NO:12); TVWSAHSGPTRMATAIAR (SEQ ID
303 NO:13); CSSFSRSGKRRGERM (SEQ ID NO:14); HVLTGCSSHWEVEDLGT
304 (SEQ ID NO:15); PVLPRGQPNQCVG (SEQ ID NO:16); SALPGTSHVL (SEQ ID
305 NO:17); RDVSTTGSTSEEAVTAVAI (SEQ ID NO:18); SQSERTARRLQAQ (SEQ
306 ID NO:2); or GYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELA (SEQ ID NO:3).

307 In another aspect, the invention provides compositions for eliciting antibodies
308 that specifically bind to PCSK9 when the composition is administered to an animal.
309 The compositions include, for example, one of the following peptides:
310 YRADEYQPPDGG (SEQ ID NO:4); TSIQSDHREIEGRVMV (SEQ ID NO:5);
311 ENVPEEDGTRFHRQ (SEQ ID NO:6); AGVVSGRDAGVAKGAS (SEQ ID NO:7);
312 VQPVGPL (SEQ ID NO:8); VGATNAQDQPVTLG (SEQ ID NO:9);
313 IIGASSDCSTCFVSQS (SEQ ID NO:10); EAWFPEDQRVLTNP (SEQ ID NO:11);
314 ALPPSTHGAGWQLFCR (SEQ ID NO:12); TVWSAHSGPTRMATAIAR (SEQ ID
315 NO:13); CSSFSRSGKRRGERM (SEQ ID NO:14); HVLTGCSSHWEVEDLGT
316 (SEQ ID NO:15); PVLPRGQPNQCVG (SEQ ID NO:16); SALPGTSHVL (SEQ ID
317 NO:17) RDVSTTGSTSEEAVTAVAI (SEQ ID NO:18); SQSERTARRLQAQ (SEQ
318 ID NO:2); GYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELA (SEQ ID NO:3); a peptide
319 thereof with less than 5 amino acid changes; or a fragment thereof (e.g., fragments

320 containing 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, or 12 amino acids). The peptide can be modified to
321 increase antigenicity, e.g., by coupling to a carrier protein.

322 The invention also features a pharmaceutical composition that includes a
323 PCSK9 binding molecule described herein. The composition includes, for example, a
324 PCSK9 binding molecule and a pharmaceutically acceptable carrier.

325 The invention also features methods of using the PCSK9 binding molecules
326 described herein.

327 For example, in one aspect, the invention features a method of increasing
328 LDL-R levels on a cell, e.g., a hepatocyte. The method includes contacting the
329 hepatocyte with a PCSK9 binding molecule (e.g., a PCSK9 binding molecule
330 including an antigen binding portion of an antibody that specifically binds to a
331 PCSK9), thereby reducing downregulation of LDL-R by PCSK9 and increasing
332 LDL-R levels on the hepatocyte.

333 In another aspect, the invention features a method of increasing LDL-c uptake
334 by a cell, e.g., a hepatocyte. The method includes contacting the hepatocyte with a
335 PCSK9 binding molecule (e.g., a PCSK9 binding molecule including an antigen
336 binding portion of an antibody that specifically binds to a PCSK9), thereby reducing
337 downregulation of LDL-R by PCSK9 and increasing LDL-c uptake by the hepatocyte.

338 In another aspect, the invention features a method of modulating PCSK9
339 activity in a subject. The method includes administering to the subject a PCSK9
340 binding molecule (e.g., a PCSK9 binding molecule including an antigen binding
341 portion of an antibody that specifically binds to a PCSK9) that modulates a biological
342 activity of the PCSK9. The PCSK9 binding molecule exhibits one or more of the
343 following activities: (a) inhibiting PCSK9 binding to a LDL-R; (b) inhibiting
344 proteolytic activity of the PCSK9; (c) inhibiting PCSK9 dependent decrease of LDL-
345 R on a hepatocyte; and (d) inhibiting PCSK9 dependent degradation of LDL-R in
346 hepatocyte cells.

347 In another aspect, the invention features a method of reducing plasma
348 cholesterol in a subject. The method includes administering to the subject a
349 pharmaceutical composition including a PCSK9 binding molecule described herein in
350 an amount effective to reduce plasma cholesterol in the subject. The amount can be
351 an amount effective to reduce LDL-c. The subject's concentration of plasma LDL-c
352 can be reduced by at least 5%, relative to plasma LDL-c prior to administering the

vr

353 composition (e.g., the concentration of plasma LDL-c is reduced by at least 10%,
354 15%, or 20%). In some embodiments, the subject is also receiving therapy with a
355 second cholesterol-reducing agent, such as a statin.

356 In various embodiments, the subject has, or is at risk for, a lipid disorder (e.g.,
357 hyperlipidemia, type I, type II, type III, type IV, or type V hyperlipidemia, secondary
358 hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, xanthomatosis, cholesterol
359 acetyltransferase deficiency). For example, the subject is hypercholesterolemic or is
360 at risk for hypercholesterolemia; the subject has, or is at risk for, atherosclerosis; the
361 subject has, or is at risk for, a cardiovascular disorder.

362 In some embodiments, the subject is statin-intolerant (e.g., the subject suffers
363 from adverse side effects when taking a statin drug), and/or the subject is resistant to
364 statin therapy. (e.g., statin therapy did not cause cholesterol reduction in the subject).

365 In some embodiments, the subject's total plasma cholesterol level is 200 mg/dl
366 or greater, prior to administration of the composition.

367 In some embodiments, the subject's plasma LDL-c level is 160 mg/dl or
368 greater, prior to administration of the composition.

369 In some embodiments, the composition is administered intravenously.

370 In some embodiments, the PCSK9 binding molecules can be used to prepare a
371 medicament for the treatment of disease associated with high cholesterol levels.

The details of one or more embodiments of the invention are set forth in the
accompanying drawings and the description below. Other features, objects, and
advantages of the invention will be apparent from the description and drawing, and
375 from the claims.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

FIG. 1 is a schematic diagram of human PCSK9, indicating the location of the
signal peptide, pro-domain, catalytic domain, and C-terminal (cysteine-rich) domain
in the linear sequence.

380 FIG. 2 is a depiction of a three-dimensional structural model of human
PCSK9. The numbers indicate the location of epitopes listed in Table 2.

FIG. 3 depicts the results of the Biacore binding affinity studies of H1-Fab
binding to hPCSK9. The sensograms (jagged black lines) are the binding curves of
H1-Fab at concentrations of 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, and 12.5 nM. The 1:1 global fit

23

(smooth black lines) gives the following binding parameters: $\kappa_d = 3.41 \times 10^{-3}$ (1/s), $\kappa_a = 3.23 \times 10^5$ (1/Ms), and $K_D = 1.05 \times 10^{-8}$ (M).

FIGS 4A-C illustrate that H1-Fab can (4A) disrupt the hPCSK9/LDL-R interaction and lead to (4B) increased surface LDL-R levels and (4C) increased LDL-uptake by HepG2 cells.

FIGS. 5A-C depict the fluid connection scheme of an automated deuterium exchange mass spectrometry (DXMS) system. Valve positions for the loading/inline proteolysis phase, desalting stage, and separation stage of the experiment are illustrated in FIGS 5A, 5B, and 5C respectively.

FIG. 6 is a schematic depicting the complementary Hydrogen/Deuterium (H/D) exchange experiments (*i.e.*, protection, control and In-D₂O experiments) and expected outcomes.

FIGS. 7A-B depict the observed change in deuteration as a function of residue number of hPCSK9 for (A) the protection experiments and (B) the In-D₂O experiments performed on hPCSK9 and hPCSK9:H1-Fab complex.

FIG. 8 depicts the cartoon crystal structure of hPCSK9 with the two amino acid stretches (*i.e.*, amino acid residues 101-107 (QAARRGY) and 123-132 (LVKMSGDLLE)) predicted to form a non-linear epitope.

DETAILED DESCRIPTION

The present invention provides molecules that bind to PCSK9 ("PCSK9 binding molecules"), particularly human antibodies and portions thereof that bind to human PCSK9 and modulate its functions. Epitopes of PCSK9 and agents that bind these epitopes are also provided herein.

The full length sequence of human PCSK9 (hPCSK9) is found under Genbank® Accession Number GI:119627065, gb|EAX06660.1, and is shown in Table 1 as SEQ ID NO: 1. An mRNA sequence encoding hPCSK9 is found under Accession Number GI:31317306, NM_174936.

Table 1. Human PCSK9 Amino Acid Sequence

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDGDGYEELVLALRSEEDGLAEAPEHGTATFHRCAK
DPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLP
HVDYIEEDSSVFAQSI PWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD FEN
VPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKGTVSGTLIGLEFIRKSQ L
VQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQP
VTLTGTLGTNFGRCVDLFAPGEDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELT LAELRQR

LIHFSAKDVINEAWFPEDQRVLTPTNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAIARCAPDEEL
LSCSSFSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHC
HQQGHVLTGCSSHWEVDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQ
5 VTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTGTSTSEEAVTAVAICCRSRHLAQASQE
LQ (SEQ ID NO:1)

The locations of the signal peptide, pro-domain, catalytic domain, and C-terminal cysteine rich domain in the linear sequence of SEQ ID NO:1 are shown in FIG. 1. Human PCSK9 is N-glycosylated at N533. It is sulfated at Y53 and in the catalytic (protease) domain. The concentration of hPCSK9 in human plasma ranges from 50-600 ng/ml (Lagace et al., 2006 J. Clin. Inv. 116(11):2995-3005). Certain mutations in hPCSK9 are associated with elevated and reduced plasma levels of LDL-c (Horton et al., 2006 Trends. Biochem. Sci. 32(2):71-77). The following mutations are associated with elevated LDL-c: S127R, F216L, D374Y, N425S, and R496W. The following mutations are associated with reduced LDL-c: R46L, ΔR97, G106R, Y142X, L253F, A443T, and C679X.

Predicted chimpanzee PCSK9 amino acid sequences are found in Genbank® under Acc. No. GI:114556790, XP_001154126; and Acc. No. GI:114556788, XP_513430. The amino acid sequence of mouse PCSK9 is found under Acc. No. GI:23956352, NP_705793. The rat PCSK9 amino acid sequence is found under Acc. No. GI:77020250, NP_954862. The amino acid sequence of hPCSK9 is 98.7% identical to chimpanzee PCSK9, 79.5% identical to rat PCSK9, and 78.9% identical mouse PCSK9.

The amino acid sequences of antigenic epitopes of hPCSK9 and their position within the hPCSK9 sequence of SEQ ID NO:1 are listed in Table 2.

Table 2. Antigenic epitopes of hPCSK9

#	amino acid sequence	SEQ ID NO:	domain	position
1	SQSERTARRLQAQ	2	Pro	89-101
2	GYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELA	3	Pro	106-134
3	YRADEYQPPDGG	4	Cat	166-177
4	TSIQSDHREIEGRVMV	5	Cat	187-202
5	ENVPEEDGTRFHRQ	6	Cat	206-219
6	AGVVSGRDAGVAKGAS	7	Cat	231-246
7	VQPVGPL	8	Cat	277-283
8	VGATNAQDQPVTLG	9	Cat	336-349
9	IIGASSDCSTCFVSQS	10	Cat	368-383
10	EAWFPEDQRVLTPTN	11	Cat	426-439
11	ALPPSTHGAGWQLFCR	12	cat/crd	443-458
12	TVWSAHSGPTRMATAIAR	13	Crd	459-476
13	CSSFSGKRRGERM	14	Crd	486-500

75

14	HVLTGCSSHWEDLGT	15	Crd	557-573
15	PVLRPRGQPNQCVG	16	Crd	577-590
16	SALPGTSHVL	17	Crd	636-645
17	RDVSTTGSTSEEAVTAI	18	Crd	659-677

pro=prodomain, cat= catalytic domain, crd= cysteine-rich domain

FIG. 2 is a depiction of a three-dimensional structural model of hPCSK9. The following sets of linear epitopes are proximal in the three-dimensional model: region 1 in the prodomain (SEQ ID NO 2 and SEQ ID NO 3); region 2 in the catalytic domain and the catalytic/cysteine-rich domain (SEQ ID NO 4 and SEQ ID NO 12); region 3 in the catalytic domain (SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 7 and SEQ ID NO 10); region 4 in the catalytic domain (SEQ ID NO 6 and SEQ ID NO 8); region 5 in the catalytic domain (SEQ ID NO 9 and SEQ ID NO 11); region 6 in the cysteine-rich domain (SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14 and SEQ ID NO 15); and region 7 in the cysteine-rich domain (SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 17 and SEQ ID NO 18).

Amino acid residues in these sets of epitopes form non-linear epitopes.

The term "antibody" as used herein refers to an intact antibody or an antigen binding fragment (i.e., "antigen-binding portion") or single chain (i.e., light or heavy chain) thereof. An intact antibody is a glycoprotein comprising at least two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as V_H) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, CH1, CH2 and CH3. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as V_L) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, C_L. The V_H and V_L regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each V_H and V_L is composed of three CDRs and four FRs arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The variable regions of the heavy and light chains contain a binding domain that interacts with an antigen. The constant regions of the antibodies may mediate the binding of the immunoglobulin to host tissues or factors, including various cells of the immune system (e.g., effector cells) and the first component (C1q) of the classical complement system.

26

The term "antigen binding portion" of an antibody, as used herein, refers to one or more fragments of an intact antibody that retain the ability to specifically bind to a given antigen (e.g., hPCSK9). Antigen binding functions of an antibody can be performed by fragments of an intact antibody. Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen binding portion" of an antibody include a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the V_L , V_H , C_L and $CH1$ domains; an $F(ab)_2$ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments (generally one from a heavy chain and one from a light chain) linked by a disulfide bridge at the hinge region; an Fd fragment consisting of the V_H and $CH1$ domains; an Fv fragment consisting of the V_L and V_H domains of a single arm of an antibody; a single domain antibody (dAb) fragment (Ward et al., 1989 Nature 341:544-546), which consists of a V_H domain; and an isolated complementarity determining region (CDR).

Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, V_L and V_H , are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by an artificial peptide linker that enables them to be made as a single protein chain in which the V_L and V_H regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see, e.g., Bird et al., 1988 Science 242:423-426; and Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Such single chain antibodies include one or more "antigen binding portions" of an antibody. These antibody fragments are obtained using conventional techniques known to those of skill in the art, and the fragments are screened for utility in the same manner as are intact antibodies.

Antigen binding portions can also be incorporated into single domain antibodies, maxibodies, minibodies, intrabodies, diabodies, triabodies, tetrabodies, v-NAR and bis-scFv (see, e.g., Hollinger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136). Antigen binding portions of antibodies can be grafted into scaffolds based on polypeptides such as Fibronectin type III (Fn3) (see U.S. Pat. No. 6,703,199, which describes fibronectin polypeptide monobodies).

Antigen binding portions can be incorporated into single chain molecules comprising a pair of tandem Fv segments (V_H - $CH1$ - V_H - $CH1$) which, together with complementary light chain polypeptides, form a pair of antigen binding regions (Zapata et al., 1995 Protein Eng. 8(10):1057-1062; and U.S. Pat. No. 5,641,870).

An "isolated PCSK9 binding molecule", as used herein, refers to a binding molecule that is substantially free of molecules having antigenic specificities for

antigens other than PCSK9 (e.g., an isolated antibody that specifically binds hPCSK9 is substantially free of antibodies that specifically bind antigens other than hPCSK9). An isolated binding molecule that specifically binds hPCSK9 may, however, have cross-reactivity to other antigens, such as PCSK9 molecules from other species. A binding molecule is "purified" if it is substantially free of cellular material.

The term "monoclonal antibody composition" as used herein refers to a preparation of antibody molecules of single molecular composition. A monoclonal antibody composition displays a single binding specificity and affinity for a particular epitope.

The term "human antibody", as used herein, is intended to include antibodies having variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from sequences of human origin. Furthermore, if the antibody contains a constant region, the constant region also is derived from such human sequences, e.g., human germline sequences, or mutated versions of human germline sequences. The human antibodies of the invention may include amino acid residues not encoded by human sequences (e.g., mutations introduced by random or site-specific mutagenesis in vitro or by somatic mutation in vivo). However, the term "human antibody", as used herein, is not intended to include antibodies in which CDR sequences derived from the germline of another mammalian species, such as a mouse, have been grafted onto human framework sequences.

The term "human monoclonal antibody" refers to an antibody displaying a single binding specificity that has variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from human sequences. In one embodiment, the human monoclonal antibody is produced by a hybridoma that includes a B cell obtained from a transgenic nonhuman animal (e.g., a transgenic mouse having a genome comprising a human heavy chain transgene and a light chain transgene) fused to an immortalized cell.

The term "recombinant human antibody", as used herein, includes any human antibody that is prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as an antibody isolated from an animal (e.g., a mouse) that is transgenic or transchromosomal for human immunoglobulin genes or a hybridoma prepared therefrom; an antibody isolated from a host cell transformed to express the human antibody, e.g., from a transfectoma; an antibody isolated from a recombinant,

combinatorial human antibody library; and an antibody prepared, expressed, created or isolated by any other means that involve splicing of all or a portion of a human immunoglobulin gene sequences to another DNA sequence. Such recombinant human antibodies have variable regions in which the framework and CDR regions are
5 derived from human germline immunoglobulin sequences. In certain embodiments, however, such recombinant human antibodies can be subjected to in vitro mutagenesis (or, when an animal transgenic for human Ig sequences is used, in vivo somatic mutagenesis) and thus the amino acid sequences of the V_H and V_L regions of the recombinant antibodies are sequences that, while derived from and related to human
10 germline V_H and V_L sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire in a human.

As used herein, "isotype" refers to the antibody class (e.g., IgM, IgE, IgG such as IgG1 or IgG4) that is encoded by the heavy chain constant region gene.

The phrases "an antibody recognizing an antigen" and "an antibody specific
15 for an antigen" are used interchangeably herein with the term "an antibody that binds specifically to an antigen."

As used herein, a PCSK9 binding molecule (e.g., an antibody or antigen binding portion thereof) that "specifically binds to PCSK9" is intended to refer to a PCSK9 binding molecule that binds to PCSK9 with a K_D of 1×10^{-7} M or less. A
20 PCSK9 binding molecule (e.g., an antibody) that "cross-reacts with an antigen" is intended to refer to a PCSK9 binding molecule that binds that antigen with a K_D of 1×10^{-6} M or less. A PCSK9 binding molecule (e.g., an antibody) that "does not cross-react" with a given antigen is intended to refer to a PCSK9 binding molecule that
25 either does not bind detectably to the given antigen, or binds with a K_D of 1×10^{-5} M or greater. In certain embodiments, such binding molecules that do not cross-react with the antigen exhibit essentially undetectable binding against these proteins in standard binding assays.

As used herein, the term "high affinity", when referring to an IgG antibody, indicates that the antibody has a K_D of 10^{-9} M or less for a target antigen.

30 As used herein, the term "an epitope within or overlapping" particular amino acid residues refers to an epitope that comprises, consists of, or overlaps with all or a portion of such residues.

24

The term "epitope" or "antigenic determinant" refers to a site on an antigen to which a PCSK9 binding molecule of the invention specifically binds. Epitopes can be formed both from contiguous amino acids or noncontiguous amino acids juxtaposed by tertiary folding of a protein. Epitopes formed from contiguous amino acids are typically retained on exposure to denaturing solvents, whereas epitopes formed by tertiary folding are typically lost on treatment with denaturing solvents. An epitope typically includes at least 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 or 15 amino acids in a unique spatial conformation. Methods of determining spatial conformation of epitopes include techniques in the art and those described herein, for example, x-ray crystallography and 2-dimensional nuclear magnetic resonance (see, *e.g.*, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Also encompassed by the present invention are PCSK9 binding molecules that bind to (i.e., recognize) the same epitope as the PCSK9 binding molecules described herein. PCSK9 binding molecules that bind to the same epitope can be identified by their ability to cross-compete with (i.e., competitively inhibit binding of) a reference PCSK9 binding molecule to a target antigen in a statistically significant manner. Competitive inhibition can occur, for example, if the PCSK9 binding molecules bind to identical or structurally similar epitopes (e.g., overlapping epitopes), or spatially proximal epitopes which, when bound, causes steric hindrance between the antibodies.

Competitive inhibition can be determined using routine assays in which the PCSK9 binding molecule under test inhibits specific binding of a reference PCSK9 binding molecule to a common antigen. Numerous types of competitive binding assays are known, for example: solid phase direct or indirect radioimmunoassay (RIA), solid phase direct or indirect enzyme immunoassay (EIA), sandwich competition assay (see Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); solid phase direct biotin-avidin EIA (see Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); solid phase direct labeled assay, solid phase direct labeled sandwich assay (see Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); solid phase direct label RIA using I-125 label (see Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); solid phase direct biotin-avidin EIA (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); and direct labeled RIA. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J.*

30

Immunol. 32:77 (1990)). Typically, such an assay involves the use of purified antigen bound to a solid surface or cells bearing either of these, an unlabeled test PCSK9 binding molecule and a labeled reference PCSK9 binding molecule. Competitive inhibition is measured by determining the amount of label bound to the solid surface or cells in the presence of the test PCSK9 binding molecule. Usually the test PCSK9 binding molecule is present in excess. Usually, when a competing PCSK9 binding molecule is present in excess, it will inhibit specific binding of a reference PCSK9 binding molecule to a common antigen by at least 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% or more.

Other techniques include, for example, epitope mapping methods, such as, x-ray analyses of crystals of antigen: PCSK9 binding molecule complexes which provides atomic resolution of the epitope. Other methods monitor the binding of the PCSK9 binding molecule to antigen fragments or mutated variations of the antigen where loss of binding due to a modification of an amino acid residue within the antigen sequence is often considered an indication of an epitope component. In addition, computational combinatorial methods for epitope mapping can also be used. These methods rely on the ability of the PCSK9 binding molecule of interest to affinity isolate specific short peptides from combinatorial phage display peptide libraries. The peptides are then regarded as leads for the definition of the epitope corresponding to the PCSK9 binding molecule used to screen the peptide library. For epitope mapping, computational algorithms have also been developed which have been shown to map conformational discontinuous epitopes.

As used herein, the term "subject" includes any human or nonhuman animal.

The term "nonhuman animal" includes all nonhuman vertebrates, e.g., mammals and non-mammals, such as nonhuman primates, rodents, rabbits, sheep, dogs, cats, horses, cows, birds, amphibians, reptiles, etc.

A nucleotide sequence is said to be "optimized" if it has been altered to encode an amino acid sequence using codons that are preferred in the production cell or organism, generally a eukaryotic cell, for example, a cell of a yeast such as *Pichia*, an insect cell, a mammalian cell such as Chinese Hamster Ovary cell (CHO) or a human cell. The optimized nucleotide sequence is engineered to encode an amino acid sequence identical or nearly identical to the amino acid sequence encoded by the original starting nucleotide sequence, which is also known as the "parental" sequence.

As used herein, the term "humaneered antibodies" means antibodies that bind the same epitope but differ in sequence. Example technologies include humaneered antibodies produced by humaneering technology of Kalobios, wherein the sequence of the antigen-binding region is derived by, e.g., mutation, rather than due to conservative amino acid replacements (See e.g., WO2004/072266, WO2005/069970).

Various aspects of the invention are described in further detail in the following subsections.

Standard assays to evaluate the ability of molecules to bind to PCSK9 of various species, and particular epitopes of PCSK9, are known in the art, including, for example, ELISAs and western blots. Determination of whether a PCSK9 binding molecule binds to a specific epitope of PCSK9 can employ a peptide epitope competition assay. For example, a PCSK9 binding molecule is incubated with a peptide corresponding to a PCSK9 epitope of interest at saturating concentrations of peptide. The preincubated PCSK9 binding molecule is tested for binding to immobilized PCSK9, e.g., by Biacore[®] analysis. Inhibition of PCSK9 binding by preincubation with the peptide indicates that the PCSK9 binding molecule binds to the peptide epitope (see, e.g., U.S. Pat. Pub. 20070072797). Binding kinetics also can be assessed by standard assays known in the art, such as by Biacore[®] analysis. Assays to evaluate the effects of PCSK9 binding molecules on functional properties of PCSK9 are described in further detail below.

Accordingly, a PCSK9 binding molecule that "inhibits" one or more of these PCSK9 functional properties (e.g., biochemical, cellular, physiological or other biological activities, or the like), as determined according to methodologies known to the art and described herein, will be understood to produce a statistically significant decrease in the particular functional property relative to that seen in the absence of the binding molecule (e.g., when a control molecule of irrelevant specificity is present). A PCSK9 binding molecule that inhibits PCSK9 activity effects such a statistically significant decrease by at least 5% of the measured parameter. In certain embodiments, an antibody or other PCSK9 binding molecule may produce a decrease in the selected functional property of at least 10%, 20%, 30%, or 50% compared to control. In some embodiments, PCSK9 inhibition is determined by measuring LDL-R levels. An increase in LDL-R levels in the presence of a PCSK9 binding molecule indicates that the PCSK9 binding molecule inhibits PCSK9.

32

Antibodies

The anti-PCSK9 antibodies described herein include human monoclonal
5 antibodies. In some embodiments, antigen binding portions of antibodies that bind to
PCSK9, (e.g., V_H and V_L chains) are "mixed and matched" to create other anti-PCSK9
binding molecules. The binding of such "mixed and matched" antibodies can be
tested using the aforementioned binding assays (e.g., ELISAs). When selecting a V_H
to mix and match with a particular V_L sequence, typically one selects a V_H that is
10 structurally similar to the V_H it replaces in the pairing with that V_L. Likewise a full
length heavy chain sequence from a particular full length heavy chain/full length light
chain pairing is generally replaced with a structurally similar full length heavy chain
sequence. Likewise, a V_L sequence from a particular V_H/V_L pairing should be
replaced with a structurally similar V_L sequence. Likewise a full length light chain
15 sequence from a particular full length heavy chain/full length light chain pairing
should be replaced with a structurally similar full length light chain sequence.
Identifying structural similarity in this context is a process well known in the art.

In other aspects, the invention provides antibodies that comprise the heavy
chain and light chain CDRs, CDR2s and CDR3s of one or more PCSK9-binding
20 antibodies, in various combinations. Given that each of these antibodies can bind to
PCSK9 and that antigen-binding specificity is provided primarily by the CDR1, 2 and
3 regions, the V_H CDR1, 2 and 3 sequences and V_L CDR1, 2 and 3 sequences can be
"mixed and matched" (i.e., CDRs from different antibodies can be mixed and
matched). PCSK9 binding of such "mixed and matched" antibodies can be tested
25 using the binding assays described herein (e.g., ELISAs). When V_H CDR sequences
are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence from a particular
V_H sequence should be replaced with a structurally similar CDR sequence(s).
Likewise, when V_L CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or
CDR3 sequence from a particular V_L sequence should be replaced with a structurally
30 similar CDR sequence(s). Identifying structural similarity in this context is a process
well known in the art.

As used herein, a human antibody comprises heavy or light chain variable
regions or full length heavy or light chains that are "the product of" or "derived from"

33

a particular germline sequence if the variable regions or full length chains of the antibody are obtained from a system that uses human germline immunoglobulin genes as the source of the sequences. In one such system, a human antibody is raised in a transgenic mouse carrying human immunoglobulin genes. The transgenic is immunized with the antigen of interest (e.g., an epitope of hPCSK9 described herein). Alternatively, a human antibody is identified by providing a human immunoglobulin gene library displayed on phage and screening the library with the antigen of interest (e.g., hPCSK9 or an hPCSK9 epitope described herein).

A human antibody that is "the product of" or "derived from" a human germline immunoglobulin sequence can be identified as such by comparing the amino acid sequence of the human antibody to the amino acid sequences of human germline immunoglobulins and selecting the human germline immunoglobulin sequence that is closest in sequence (i.e., greatest % identity) to the sequence of the human antibody. A human antibody that is "the product of" or "derived from" a particular human germline immunoglobulin sequence may contain amino acid differences as compared to the germline-encoded sequence, due to, for example, naturally occurring somatic mutations or artificial site-directed mutations. However, a selected human antibody typically has an amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence encoded by a human germline immunoglobulin gene and contains amino acid residues that identify the human antibody as being human when compared to the germline immunoglobulin amino acid sequences of other species (e.g., murine germline sequences). In certain cases, a human antibody may be at least 60%, 70%, 80%, 90%, or at least 95%, or even at least 96%, 97%, 98%, or 99% identical in amino acid sequence to the amino acid sequence encoded by the germline immunoglobulin gene.

The percent identity between two sequences is a function of the number of identity positions shared by the sequences (i.e., % identity = # of identity positions/total # of positions x 100), taking into account the number of gaps, and the length of each gap, that need to be introduced for optimal alignment of the two sequences. The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences is determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (1988 Comput. Appl. Biosci., 4:11-17) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4.

34

Typically, a V_H or V_L of a human antibody derived from a particular human germline sequence will display no more than 10 amino acid differences from the amino acid sequence encoded by the human germline immunoglobulin gene. In certain cases, the V_H or V_L of the human antibody may display no more than 5, or
5 even no more than 4, 3, 2, or 1 amino acid difference from the amino acid sequence encoded by the germline immunoglobulin gene.

Camelid antibodies

Antibody proteins obtained from members of the camel and dromedary
10 (*Camelus bactrianus* and *Camelus dromedarius*) family, including New World members such as llama species (*Lama pacos*, *Lama glama* and *Lama vicugna*), have been characterized with respect to size, structural complexity and antigenicity for human subjects. Certain IgG antibodies found in nature in this family of mammals lack light chains, and are thus structurally distinct from the four chain quaternary
15 structure having two heavy and two light chains typical for antibodies from other animals. See WO 94/04678.

A region of the camelid antibody that is the small, single variable domain identified as V_{HH} can be obtained by genetic engineering to yield a small protein having high affinity for a target, resulting in a low molecular weight, antibody-derived
20 protein known as a "camelid nanobody". See U.S. Pat. No. 5,759,808; see also Stijlemans et al., 2004 J. Biol. Chem. 279: 1256-1261; Dumoulin et al., 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger et al., 2003 Bioconjugate Chem. 14: 440-448; Cortez-Retamozo et al., 2002 Int. J. Cancer 89: 456-62; and Lauwereys. et al., 1998 EMBO J. 17: 3512-3520. Engineered libraries of camelid antibodies and antibody fragments
25 are commercially available, for example, from Ablynx, Ghent, Belgium. As with other antibodies of non-human origin, an amino acid sequence of a camelid antibody can be altered recombinantly to obtain a sequence that more closely resembles a human sequence, i.e., the nanobody can be "humanized". Thus the natural low antigenicity of camelid antibodies to humans can be further reduced.

30 The camelid nanobody has a molecular weight approximately one-tenth that of a human IgG molecule, and the protein has a physical diameter of only a few nanometers. One consequence of the small size is the ability of camelid nanobodies to bind to antigenic sites that are functionally invisible to larger antibody proteins, i.e.,

31

camelid nanobodies are useful as reagents to detect antigens that are otherwise cryptic using classical immunological techniques, and as possible therapeutic agents. Thus, yet another consequence of small size is that a camelid nanobody can inhibit as a result of binding to a specific site in a groove or narrow cleft of a target protein, and hence can serve in a capacity that more closely resembles the function of a classical low molecular weight drug than that of a classical antibody.

The low molecular weight and compact size further result in camelid nanobodies' being extremely thermostable, stable to extreme pH and to proteolytic digestion, and poorly antigenic. Another consequence is that camelid nanobodies readily move from the circulatory system into tissues, and even cross the blood-brain barrier and can treat disorders that affect nervous tissue. Nanobodies can further facilitate drug transport across the blood brain barrier. See U.S. Pat. Pub. No. 20040161738, published August 19, 2004. These features combined with the low antigenicity in humans indicate great therapeutic potential. Further, these molecules can be fully expressed in prokaryotic cells such as *E. coli*.

Accordingly, a feature of the present invention is a camelid antibody or camelid nanobody having high affinity for PCSK9. In certain embodiments herein, the camelid antibody or nanobody is naturally produced in the camelid animal, i.e., is produced by the camelid following immunization with PCSK9 or a peptide fragment thereof, using techniques described herein for other antibodies. Alternatively, the anti-PCSK9 camelid nanobody is engineered, i.e., produced by selection, for example from a library of phage displaying appropriately mutagenized camelid nanobody proteins using panning procedures with PCSK9 or a PCSK9 epitope described herein as a target. Engineered nanobodies can further be customized by genetic engineering to increase the half life in a recipient subject from 45 minutes to two weeks.

Diabodies

Diabodies are bivalent, bispecific molecules in which V_H and V_L domains are expressed on a single polypeptide chain, connected by a linker that is too short to allow for pairing between the two domains on the same chain. The V_H and V_L domains pair with complementary domains of another chain, thereby creating two antigen binding sites (see e.g., Holliger et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al., 1994 Structure 2:1121-1123). Diabodies can be produced

by expressing two polypeptide chains with either the structure $V_{HA}-V_{LB}$ and $V_{HB}-V_{LA}$ (V_H-V_L configuration), or $V_{LA}-V_{HB}$ and $V_{LB}-V_{HA}$ (V_L-V_H configuration) within the same cell. Most of them can be expressed in soluble form in bacteria.

Single chain diabodies (scDb) are produced by connecting the two diabody-
5 forming polypeptide chains with linker of approximately 15 amino acid residues (see Holliger and Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(3-4):128-30; Wu et al., 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36). scDb can be expressed in bacteria in soluble, active monomeric form (see Holliger and Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(34): 128-30; Wu et al., 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36;
10 Pluckthun and Pack, 1997 Immunotechnology, 3(2): 83-105; Ridgway et al., 1996 Protein Eng., 9(7):617-21).

A diabody can be fused to Fc to generate a "di-diabody" (see Lu et al., 2004 J. Biol. Chem., 279(4):2856-65).

15 Engineered and modified antibodies

An antibody of the invention can be prepared using an antibody having one or more V_H and/or V_L sequences as starting material to engineer a modified antibody, which modified antibody may have altered properties from the starting antibody. An antibody can be engineered by modifying one or more residues within one or both
20 variable regions (i. e., V_H and/or V_L), for example within one or more CDR regions and/or within one or more framework regions. Additionally or alternatively, an antibody can be engineered by modifying residues within the constant region(s), for example to alter the effector function(s) of the antibody.

One type of variable region engineering that can be performed is CDR
25 grafting. Antibodies interact with target antigens predominantly through amino acid residues that are located in the six heavy and light chain CDRs. For this reason, the amino acid sequences within CDRs are more diverse between individual antibodies than sequences outside of CDRs. Because CDR sequences are responsible for most antibody-antigen interactions, it is possible to express recombinant antibodies that
30 mimic the properties of specific naturally occurring antibodies by constructing expression vectors that include CDR sequences from the specific naturally occurring antibody grafted onto framework sequences from a different antibody with different properties (see, e.g., Riechmann et al., 1998 Nature 332:323-327; Jones et al., 1986

37

Nature 321:522-525; Queen et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; U.S. Pat. No. 5,225,539, and U.S. Pat. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370).

Framework sequences can be obtained from public DNA databases or
5 published references that include germline antibody gene sequences. For example, germline DNA sequences for human heavy and light chain variable region genes can be found in the "VBase" human germline sequence database (available on the Internet at www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), as well as in Kabat et al., 1991 Sequences of
10 Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson et al., 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox et al., 1994 Eur. J. Immunol. 24:827-836; the contents of each of which are expressly incorporated herein by reference.

The V_H CDR1, 2 and 3 sequences and the V_L CDR1, 2 and 3 sequences can be grafted onto framework regions that have the identical sequence as that found in the
15 germline immunoglobulin gene from which the framework sequence is derived, or the CDR sequences can be grafted onto framework regions that contain one or more mutations as compared to the germline sequences. For example, it has been found that in certain instances it is beneficial to mutate residues within the framework regions to maintain or enhance the antigen binding ability of the antibody (see e.g.,
20 U.S. Pat. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370).

CDRs can also be grafted into framework regions of polypeptides other than immunoglobulin domains. Appropriate scaffolds form a conformationally stable framework that displays the grafted residues such that they form a localized surface and bind the target of interest (e.g., PCSK9). For example, CDRs can be grafted onto
25 a scaffold in which the framework regions are based on fibronectin, ankyrin, lipocalin, neocarzinostatin, cytochrome b, CP1 zinc finger, PST1, coiled coil, LACI-D1, Z domain or tendramisat (See e.g., Nygren and Uhlen, 1997 Current Opinion in Structural Biology, 7, 463-469).

Another type of variable region modification is mutation of amino acid
30 residues within the V_H and/or V_L CDR1, CDR2 and/or CDR3 regions to thereby improve one or more binding properties (e.g., affinity) of the antibody of interest, known as "affinity maturation." Site-directed mutagenesis or PCR-mediated mutagenesis can be performed to introduce the mutation(s), and the effect on antibody

38

binding, or other functional property of interest, can be evaluated in in vitro or in vivo assays as described herein. Conservative modifications can be introduced. The mutations may be amino acid substitutions, additions or deletions. Moreover, typically no more than one, two, three, four or five residues within a CDR region are altered.

Engineered antibodies of the invention include those in which modifications have been made to framework residues within V_H and/or V_L, e.g., to improve the properties of the antibody. Typically such framework modifications are made to decrease the immunogenicity of the antibody. For example, one approach is to "backmutate" one or more framework residues to the corresponding germline sequence. More specifically, an antibody that has undergone somatic mutation may contain framework residues that differ from the germline sequence from which the antibody is derived. Such residues can be identified by comparing the antibody framework sequences to the germline sequences from which the antibody is derived. To return the framework region sequences to their germline configuration, the somatic mutations can be "backmutated" to the germline sequence by, for example, site-directed mutagenesis or PCR-mediated mutagenesis. Such "backmutated" antibodies are also intended to be encompassed by the invention.

Another type of framework modification involves mutating one or more residues within the framework region, or even within one or more CDR regions, to remove T cell -epitopes to thereby reduce the potential immunogenicity of the antibody. This approach is also referred to as "deimmunization" and is described in further detail in U.S. Pat. Pub. No. 20030153043 by Carr et al.

In addition or alternative to modifications made within the framework or CDR regions, antibodies of the invention may be engineered to include modifications within the Fc region, typically to alter one or more functional properties of the antibody, such as serum half-life, complement fixation, Fc receptor binding, and/or antigen-dependent cellular cytotoxicity. Furthermore, an antibody of the invention may be chemically modified (e.g., one or more chemical moieties can be attached to the antibody) or be modified to alter its glycosylation, again to alter one or more functional properties of the antibody.

In one embodiment, the hinge region of CH1 is modified such that the number of cysteine residues in the hinge region is altered, e.g., increased or decreased. This

39

approach is described further in U.S. Pat. No. 5,677,425 by Bodmer et al. The number of cysteine residues in the hinge region of CH1 is altered to, for example, facilitate assembly of the light and heavy chains or to increase or decrease the stability of the antibody.

5 In another embodiment, the Fc hinge region of an antibody is mutated to decrease the biological half-life of the antibody. More specifically, one or more amino acid mutations are introduced into the CH2-CH3 domain interface region of the Fc-hinge fragment such that the antibody has impaired Staphylococcal protein A (SpA) binding relative to native Fc-hinge domain SpA binding. This approach is described in further detail in U.S. Pat. No. 6,165,745 by Ward et al.

10 In another embodiment, the antibody is modified to increase its biological half-life. Various approaches are possible. For example, U.S. Pat. No. 6,277,375 describes the following mutations in an IgG that increase its half-life in vivo: T252L, T254S, T256F. Alternatively, to increase the biological half life, the antibody can be altered within the CH1 or CL region to contain a salvage receptor binding epitope taken from two loops of a CH2 domain of an Fc region of an IgG, as described in U.S. Pat. Nos. 5,869,046 and 6,121,022 by Presta et al.

15 In yet other embodiments, the Fc region is altered by replacing at least one amino acid residue with a different amino acid residue to alter the effector functions of the antibody. For example, one or more amino acids can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has an altered affinity for an effector ligand but retains the antigen-binding ability of the parent antibody. The effector ligand to which affinity is altered can be, for example, an Fc receptor or the C1 component of complement. This approach is described in further detail in U.S. Pat. Nos. 5,624,821 and 5,648,260, both by Winter et al.

20 In another embodiment, one or more amino acids selected from amino acid residues can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has altered C1q binding and/or reduced or abolished complement dependent cytotoxicity (CDC). This approach is described in further detail in U.S. Pat. Nos. 6,194,551 by Idusogie et al.

30 In another embodiment, one or more amino acid residues are altered to thereby alter the ability of the antibody to fix complement. This approach is described further in WO 94/29351 by Bodmer et al.

40

In yet another embodiment, the Fc region is modified to increase the ability of the antibody to mediate antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and/or to increase the affinity of the antibody for an Fcγ receptor by modifying one or more amino acids. This approach is described further in WO 00/42072 by Presta.

5 Moreover, the binding sites on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII and FcRn have been mapped and variants with improved binding have been described (see Shields, R.L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

In still another embodiment, the glycosylation of an antibody is modified. For example, an aglycosylated antibody can be made (i.e., the antibody lacks
10 glycosylation). Glycosylation can be altered, for example, to increase the affinity of the antibody for an antigen. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, altering one or more sites of glycosylation within the antibody sequence. For example, one or more amino acid substitutions can be made that result in elimination of one or more variable region framework glycosylation sites to thereby
15 eliminate glycosylation at that site. Such aglycosylation may increase the affinity of the antibody for antigen. Such an approach is described in further detail in U.S. Pat. Nos. 5,714,350 and 6,350,861 by Co et al.

Additionally or alternatively, an antibody can be made that has an altered type of glycosylation, such as a hypofucosylated antibody having reduced amounts of
20 fucosyl residues or an antibody having increased bisecting GlcNac structures. Such altered glycosylation patterns have been demonstrated to increase the ADCC ability of antibodies. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, expressing the antibody in a host cell with altered glycosylation machinery. Cells with altered glycosylation machinery have been described in the art and can be used
25 as host cells in which to express recombinant antibodies of the invention to thereby produce an antibody with altered glycosylation. For example, EP 1,176,195 by Hang et al. describes a cell line with a functionally disrupted FUT8 gene, which encodes a fucosyl transferase, such that antibodies expressed in such a cell line exhibit hypofucosylation. PCT Pub. WO 03/035835 by Presta describes a variant CHO cell
30 line, Lec13 cells, with reduced ability to attach fucose to Asn(297)-linked carbohydrates, also resulting in hypofucosylation of antibodies expressed in that host cell (see also Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). WO 99/54342 by Umana et al. describes cell lines engineered to express glycoprotein-

41

modifying glycosyl transferases (e.g., beta(1,4)-N acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII)) such that antibodies expressed in the engineered cell lines exhibit increased bisecting GlcNAc structures which results in increased ADCC activity of the antibodies (see also Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180).

5 Another modification of the antibodies herein that is contemplated by the invention is pegylation. An antibody can be pegylated to, for example, increase the biological (e.g., serum) half-life of the antibody. To pegylate an antibody, the antibody, or fragment thereof, typically is reacted with polyethylene glycol (PEG), such as a reactive ester or aldehyde derivative of PEG, under conditions in which one
10 or more PEG moieties become attached to the antibody or antibody fragment. The pegylation can be carried out by an acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive PEG molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer). As used herein, the term "polyethylene glycol" is intended to encompass any of the forms of PEG that have been used to derivatize other proteins, such as mono (C1-C10) alkoxy-
15 or aryloxy-polyethylene glycol or polyethylene glycol-maleimide. In certain embodiments, the antibody to be pegylated is an aglycosylated antibody. Methods for pegylating proteins are known in the art and can be applied to the antibodies of the invention. See for example, EP 0 154 316 by Nishimura et al. and EP 0 401 384 by Ishikawa et al.

20 In addition, pegylation can be achieved in any part of a PCSK9 binding polypeptide of the invention by the introduction of a nonnatural amino acid. Certain nonnatural amino acids can be introduced by the technology described in Deiters et al., J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003; Wang and Schultz, Science 301:964-967, 2003; Wang et al., Science 292:498-500, 2001; Zhang et al., Science 303:371-
25 373, 2004 or in US Patent No. 7,083,970. Briefly, some of these expression systems involve site-directed mutagenesis to introduce a nonsense codon, such as an amber TAG, into the open reading frame encoding a polypeptide of the invention. Such expression vectors are then introduced into a host that can utilize a tRNA specific for the introduced nonsense codon and charged with the nonnatural amino acid of choice.
30 Particular nonnatural amino acids that are beneficial for purpose of conjugating moieties to the polypeptides of the invention include those with acetylene and azido side chains. The polypeptides containing these novel amino acids can then be pegylated at these chosen sites in the protein.

42

Methods of engineering antibodies

As discussed above, anti-PCSK9 antibodies can be used to create new anti-PCSK9 antibodies by modifying full length heavy chain and/or light chain sequences, V_H and/or V_L sequences, or the constant region(s) attached thereto. For example, one or more CDR regions of the antibodies can be combined recombinantly with known framework regions and/or other CDRs to create new, recombinantly-engineered, anti-PCSK9 antibodies. Other types of modifications include those described in the previous section. The starting material for the engineering method is one or more of the V_H and/or V_L sequences, or one or more CDR regions thereof. To create the engineered antibody, it is not necessary to actually prepare (i.e., express as a protein) an antibody having one or more of the V_H and/or V_L sequences, or one or more CDR regions thereof. Rather, the information contained in the sequence(s) is used as the starting material to create a "second generation" sequence(s) derived from the original sequence(s) and then the "second generation" sequence(s) is prepared and expressed as a protein.

Standard molecular biology techniques can be used to prepare and express the altered antibody sequence. The antibody encoded by the altered antibody sequence(s) is one that retains one, some or all of the functional properties of the anti-PCSK9 antibody from which it is derived, which functional properties include, but are not limited to, specifically binding to PCSK9, inhibiting autocatalytic cleavage, inhibiting LDL-R binding, inhibiting LDL-R degradation. The functional properties of the altered antibodies can be assessed using standard assays available in the art and/or described herein (e.g., ELISAs).

In certain embodiments of the methods of engineering antibodies of the invention, mutations can be introduced randomly or selectively along all or part of an anti-PCSK9 antibody coding sequence and the resulting modified anti-PCSK9 antibodies can be screened for binding activity and/or other functional properties (e.g., inhibiting autocatalytic cleavage, inhibiting LDL-R binding, inhibiting LDL-R degradation) as described herein. Mutational methods have been described in the art. For example, PCT Pub. WO 02/092780 by Short describes methods for creating and screening antibody mutations using saturation mutagenesis, synthetic ligation assembly, or a combination thereof. Alternatively, WO 03/074679 by Lazar et al.

43

describes methods of using computational screening methods to optimize physiochemical properties of antibodies.

Non-antibody PCSK9 binding molecules

5 The invention further provides PCSK9 binding molecules that exhibit functional properties of antibodies but derive their framework and antigen binding portions from other polypeptides (e.g., polypeptides other than those encoded by antibody genes or generated by the recombination of antibody genes in vivo). The antigen binding domains (e.g., PCSK9 binding domains) of these binding molecules
10 are generated through a directed evolution process. See U.S. Pat. No. 7,115,396. Molecules that have an overall fold similar to that of a variable domain of an antibody (an "immunoglobulin-like" fold) are appropriate scaffold proteins. Scaffold proteins suitable for deriving antigen binding molecules include fibronectin or a fibronectin dimer, tenascin, N-cadherin, E-cadherin, ICAM, titin, GCSF-receptor, cytokine
15 receptor, glycosidase inhibitor, antibiotic chromoprotein, myelin membrane adhesion molecule P0, CD8, CD4, CD2, class I MHC, T-cell antigen receptor, CD1, C2 and I-set domains of VCAM-1, I-set immunoglobulin domain of myosin-binding protein C, I-set immunoglobulin domain of myosin-binding protein H, I-set immunoglobulin domain of telokin, NCAM, twitchin, neuroglian, growth hormone receptor,
20 erythropoietin receptor, prolactin receptor, interferon-gamma receptor, β -galactosidase/glucuronidase, β -glucuronidase, transglutaminase, T-cell antigen receptor, superoxide dismutase, tissue factor domain, cytochrome F, green fluorescent protein, GroEL, and thaumatin.

 The antigen binding domain (e.g., the immunoglobulin-like fold) of the non-
25 antibody binding molecule can have a molecular mass less than 10 kD or greater than 7.5 kD (e.g., a molecular mass between 7.5-10 kD). The protein used to derive the antigen binding domain is a naturally occurring mammalian protein (e.g., a human protein), and the antigen binding domain includes up to 50% (e.g., up to 34%, 25%, 20%, or 15%), mutated amino acids as compared to the immunoglobulin-like fold of
30 the protein from which it is derived. The domain having the immunoglobulin-like fold generally consists of 50-150 amino acids (e.g., 40-60 amino acids).

 To generate non-antibody binding molecules, a library of clones is created in which sequences in regions of the scaffold protein that form antigen binding surfaces

44

(e.g., regions analogous in position and structure to CDRs of an antibody variable domain immunoglobulin fold) are randomized. Library clones are tested for specific binding to the antigen of interest (e.g., hPCSK9) and for other functions (e.g., inhibition of biological activity of PCSK9). Selected clones can be used as the basis for further randomization and selection to produce derivatives of higher affinity for the antigen.

High affinity binding molecules are generated, for example, using the tenth module of fibronectin III (¹⁰Fn3) as the scaffold. A library is constructed for each of three CDR-like loops of ¹⁰Fn3 at residues 23-29, 52-55, and 78-87. To construct each library, DNA segments encoding sequence overlapping each CDR-like region are randomized by oligonucleotide synthesis. Techniques for producing selectable ¹⁰Fn3 libraries are described in U.S. Pat. Nos. 6,818,418 and 7,115,396; Roberts and Szostak, 1997 Proc. Natl. Acad. Sci USA 94:12297; U.S. Pat. No. 6,261,804; U.S. Pat. No. 6,258,558; and Szostak et al. WO98/31700.

Non-antibody binding molecules can be produced as dimers or multimers to increase avidity for the target antigen. For example, the antigen binding domain is expressed as a fusion with a constant region (Fc) of an antibody that forms Fc-Fc dimers. See, e.g., U.S. Pat. No. 7,115,396.

Nucleic acid molecules encoding antibodies of the invention

Another aspect of the invention pertains to nucleic acid molecules that encode the PCSK9 binding molecules of the invention. The nucleic acids may be present in whole cells, in a cell lysate, or may be nucleic acids in a partially purified or substantially pure form. A nucleic acid is "isolated" or "rendered substantially pure" when purified away from other cellular components or other contaminants, e.g., other cellular nucleic acids or proteins, by standard techniques, including alkaline/SDS treatment, CsCl banding, column chromatography, agarose gel electrophoresis and others well known in the art. See, F. Ausubel, et al., ed. 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. A nucleic acid of the invention can be, for example, DNA or RNA and may or may not contain intronic sequences. In an embodiment, the nucleic acid is a cDNA molecule. The nucleic acid may be present in a vector such as a phage display vector, or in a recombinant plasmid vector.

45

Nucleic acids of the invention can be obtained using standard molecular biology techniques. For antibodies expressed by hybridomas (e.g., hybridomas prepared from transgenic mice carrying human immunoglobulin genes as described further below), cDNAs encoding the light and heavy chains of the antibody made by the hybridoma can be obtained by standard PCR amplification or cDNA cloning techniques. For antibodies obtained from an immunoglobulin gene library (e.g., using phage display techniques), nucleic acid encoding the antibody can be recovered from various phage clones that are members of the library.

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

The isolated DNA encoding the V_H region can be converted to a full-length heavy chain gene by operatively linking the V_H -encoding DNA to another DNA molecule encoding heavy chain constant regions (CH1, CH2 and CH3). The sequences of human heavy chain constant region genes are known in the art (see e.g., Kabat et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The heavy chain constant region can be an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM or IgD constant region. For a Fab fragment heavy chain gene, the V_H -encoding DNA can be operatively linked to another DNA molecule encoding only the heavy chain CH1 constant region.

The isolated DNA encoding the V_L region can be converted to a full-length light chain gene (as well as to a Fab light chain gene) by operatively linking the V_L -encoding DNA to another DNA molecule encoding the light chain constant region, CL. The sequences of human light chain constant region genes are known in the art

46

(see e.g., Kabat et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The light chain constant region can be a kappa or a lambda constant region.

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

Monoclonal Antibody Generation

Monoclonal antibodies (mAbs) can be produced by a variety of techniques, including conventional monoclonal antibody methodology e.g., the standard somatic cell hybridization technique of Kohler and Milstein (1975 Nature, 256:495), or using library display methods, such as phage display.

An animal system for preparing hybridomas is the murine system. Hybridoma production in the mouse is a well established procedure. Immunization protocols and techniques for isolation of immunized splenocytes for fusion are known in the art. Fusion partners (e.g., murine myeloma cells) and fusion procedures are also known.

Chimeric or humanized antibodies of the present invention can be prepared based on the sequence of a murine monoclonal antibody prepared as described above. DNA encoding the heavy and light chain immunoglobulins can be obtained from the murine hybridoma of interest and engineered to contain non-murine (e.g., human) immunoglobulin sequences using standard molecular biology techniques. For example, to create a chimeric antibody, the murine variable regions can be linked to human constant regions using methods known in the art (see e.g., U.S. Pat. No. 4,816,567 to Cabilly et al.). To create a humanized antibody, the murine CDR regions can be inserted into a human framework using methods known in the art. See e.g., U.S. Pat. No. 5,225,539, and U.S. Pat. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370.

47

In a certain embodiment, the antibodies of the invention are human monoclonal antibodies. Such human monoclonal antibodies directed against PCSK9 can be generated using transgenic or transchromosomic mice carrying parts of the human immune system rather than the mouse system. These transgenic and transchromosomic mice include mice referred to herein as HuMAb mice and KM mice, respectively, and are collectively referred to herein as "human Ig mice."

The HuMAb mouse[®] (Medarex, Inc.) contains human immunoglobulin gene miniloci that encode un-rearranged human heavy (μ and γ) and κ light chain immunoglobulin sequences, together with targeted mutations that inactivate the endogenous μ and κ chain loci (see, e.g., Lonberg et al., 1994 Nature 368(6474): 856-859). Accordingly, the mice exhibit reduced expression of mouse IgM or κ , and in response to immunization, the introduced human heavy and light chain transgenes undergo class switching and somatic mutation to generate high affinity human IgGk monoclonal (Lonberg, N. et al., 1994 supra; reviewed in Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, and Harding, F. and Lonberg, N., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546). The preparation and use of HuMAb mice, and the genomic modifications carried by such mice, is further described in Taylor, L. et al., 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al., 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuaillon et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi et al., 1993 Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al., 1993 EMBO J. 12: 821-830; Tuaillon et al., 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al., 1994 International Immunology 579-591; and Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851, the contents of all of which are hereby specifically incorporated by reference in their entirety. See further, U.S. Pat. Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; and 5,770,429; all to Lonberg and Kay; U.S. Pat. No. 5,545,807 to Surani et al.; PCT Pub. Nos. WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 and WO 99/45962, all to Lonberg and Kay; and PCT Pub. No. WO 01/14424 to Korman et al.

In another embodiment, human antibodies of the invention can be raised using a mouse that carries human immunoglobulin sequences on transgenes and transchromosomes, such as a mouse that carries a human heavy chain transgene and a

human light chain transchromosome. Such mice, referred to herein as "KM mice", are described in detail in WO 02/43478.

Still further, alternative transgenic animal systems expressing human immunoglobulin genes are available in the art and can be used to raise anti-PCSK9 antibodies of the invention. For example, an alternative transgenic system referred to as the Xenomouse® (Abgenix, Inc.) can be used. Such mice are described in, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 and 6,162,963 to Kucherlapati et al.

Moreover, alternative transchromosomic animal systems expressing human immunoglobulin genes are available in the art and can be used to raise anti-PCSK9 antibodies of the invention. For example, mice carrying both a human heavy chain transchromosome and a human light chain transchromosome, referred to as "TC mice" can be used; such mice are described in Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Furthermore, cows carrying human heavy and light chain transchromosomes have been described in the art (Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20:889-894) and can be used to raise anti-PCSK9 antibodies of the invention.

Human monoclonal antibodies of the invention can also be prepared using phage display methods for screening libraries of human immunoglobulin genes. Such phage display methods for isolating human antibodies are established in the art. See for example: U.S. Pat. Nos. 5,223,409; 5,403,484; and 5,571,698 to Ladner et al.; U.S. Pat. Nos. 5,427,908 and 5,580,717 to Dower et al.; U.S. Pat. Nos. 5,969,108 and 6,172,197 to McCafferty et al.; and U.S. Pat. Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 and 6,593,081 to Griffiths et al. Libraries can be screened for binding to full length PCSK9 or to a particular epitope of PCSK9.

Human monoclonal antibodies of the invention can also be prepared using SCID mice into which human immune cells have been reconstituted such that a human antibody response can be generated upon immunization. Such mice are described in, for example, U.S. Pat. Nos. 5,476,996 and 5,698,767 to Wilson et al.

Generation of human monoclonal antibodies in Human Ig Mice

Purified recombinant human PCSK9 expressed in prokaryotic cells (e.g., *E. coli*) or eukaryotic cells (e.g., mammalian cells, e.g., HEK293 cells) can be used as

49

the antigen. The protein can be conjugated to a carrier, such as keyhole limpet hemocyanin (KLH).

Fully human monoclonal antibodies to PCSK9 are prepared using HCo7, HCo12 and HCo17 strains of HuMab transgenic mice and the KM strain of transgenic transchromosomal mice, each of which express human antibody genes. In each of these mouse strains, the endogenous mouse kappa light chain gene can be homozygously disrupted as described in Chen et al., 1993 EMBO J.12:811-820 and the endogenous mouse heavy chain gene can be homozygously disrupted as described in Example 1 of WO 01109187. Each of these mouse strains carries a human kappa light chain transgene, KCo5, as described in Fishwild et al., 1996 Nature Biotechnology 14:845-851. The HCo7 strain carries the HCo7 human heavy chain transgene as described in U.S. Pat. Nos. 5,545,806; 5,625,825; and 5,545,807. The HCo12 strain carries the HCo12 human heavy chain transgene as described in Example 2 of WO 01/09187. The HCo17 strain carries the HCo17 human heavy chain transgene. The KNM strain contains the SC20 transchromosome as described in WO 02/43478.

To generate fully human monoclonal antibodies to PCSK9, HuMab mice and KM mice are immunized with purified recombinant PCSK9, a PCSK9 fragment, or a conjugate thereof (e.g., PCSK9-KLH) as antigen. General immunization schemes for HuMab mice are described in Lonberg, N. et al., 1994 Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14:845-851 and WO 98/24884. The mice are 6-16 weeks of age upon the first infusion of antigen. A purified recombinant preparation (5-50 µg) of the antigen is used to immunize the HuMab mice and KM mice in the peritoneal cavity, subcutaneously (Sc) or by footpad injection.

Transgenic mice are immunized twice with antigen in complete Freund's adjuvant or Ribi adjuvant either in the peritoneal cavity (IP), subcutaneously (Sc) or by footpad (FP), followed by 3-21 days IP, Sc or FP immunization (up to a total of 11 immunizations) with the antigen in incomplete Freund's or Ribi adjuvant. The immune response is monitored by retroorbital bleeds. The plasma is screened by ELISA, and mice with sufficient titers of anti-PCSK9 human immunoglobulin are used for fusions. Mice are boosted intravenously with antigen 3 and 2 days before sacrifice and removal of the spleen. Typically, 10-35 fusions for each antigen are

performed. Several dozen mice are immunized for each antigen. A total of 82 mice of the HCo7, HCo12, HCo17 and KM mice strains are immunized with PCSK9.

To select HuMab or KM mice producing antibodies that bound PCSK9, sera from immunized mice can be tested by ELISA as described by Fishwild, D. et al.,
5 1996. Briefly, microtiter plates are coated with purified recombinant PCSK9 at 1-2 µg/ml in PBS, 50 µl/wells incubated 4 °C overnight then blocked with 200 µl/well of 5% chicken serum in PBS/Tween (0.05%). Dilutions of plasma from PCSK9-immunized mice are added to each well and incubated for 1-2 hours at ambient temperature. The plates are washed with PBS/Tween and then incubated with a goat-anti-human IgG Fc
10 polyclonal antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for 1 hour at room temperature. After washing, the plates are developed with ABTS substrate (Sigma, A-1888, 0.22 mg/ml) and analyzed by spectrophotometer at OD 415-495. Splenocytes of mice that developed the highest titers of anti-PCSK9 antibodies are used for fusions. Fusions are performed and hybridoma supernatants are tested for anti-
15 PCSK9 activity by ELISA.

The mouse splenocytes, isolated from the HuMab mice and KM mice, are fused with PEG to a mouse myeloma cell line based upon standard protocols. The resulting hybridomas are then screened for the production of antigen-specific antibodies. Single cell suspensions of splenic lymphocytes from immunized mice are
20 fused to one-fourth the number of SP2/0 nonsecreting mouse myeloma cells (ATCC, CRL 1581) with 50% PEG (Sigma). Cells are plated at approximately 1×10^5 /well in flat bottom microtiter plates, followed by about two weeks of incubation in selective medium containing 10% fetal bovine serum, 10% P388D 1(ATCC, CRL TIB-63) conditioned medium, 3-5% Origen[®] (IGEN) in DMEM (Mediatech, CRL 10013, with
25 high glucose, L-glutamine and sodium pyruvate) plus 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-mercaptoethanol, 50 µg/ml gentamycin and 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). After 1-2 weeks, cells are cultured in medium in which the HAT is replaced with HT. Individual wells are then screened by ELISA for human anti-PCSK9 monoclonal IgG antibodies. Once extensive hybridoma growth occurred, medium is monitored usually
30 after 10-14 days. The antibody secreting hybridomas are replated, screened again and, if still positive for human IgG, anti-PCSK9 monoclonal antibodies are subcloned at least twice by limiting dilution. The stable subclones are then cultured in vitro to

generate small amounts of antibody in tissue culture medium for further characterization.

Generation of hybridomas producing human monoclonal antibodies

5 To generate hybridomas producing human monoclonal antibodies of the invention, splenocytes and/or lymph node cells from immunized mice can be isolated and fused to an appropriate immortalized cell line, such as a mouse myeloma cell line. The resulting hybridomas can be screened for the production of antigen-specific antibodies. For example, single cell suspensions of splenic lymphocytes from
10 immunized mice can be fused to one-sixth the number of P3X63-Ag8.653 nonsecreting mouse myeloma cells (ATCC, CRL 1580) with 50% PEG. Cells are plated at approximately 2×145 in flat bottom microtiter plates, followed by a two week incubation in selective medium containing 20% fetal Clone Serum, 18% "653" conditioned media, 5% Origen[®] (IGEN), 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate,
15 5mM HEPES, 0.055 mM 2-mercaptoethanol, 50 units/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamycin and 1X HAT (Sigma; the HAT is added 24 hours after the fusion). After approximately two weeks, cells can be cultured in medium in which the HAT is replaced with HT. Individual wells can then be screened by ELISA for human monoclonal IgM and IgG antibodies. Once extensive hybridoma growth
20 occurs, medium can be observed usually after 10-14 days. The antibody secreting hybridomas can be replated, screened again, and if still positive for human IgG, the monoclonal antibodies can be subcloned at least twice by limiting dilution. The stable subclones can then be cultured in vitro to generate small amounts of antibody in tissue culture medium for characterization.

25 To purify human monoclonal antibodies, selected hybridomas can be grown in two-liter spinner-flasks for monoclonal antibody purification. Supernatants can be filtered and concentrated before affinity chromatography with protein A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Eluted IgG can be checked by gel electrophoresis and high performance liquid chromatography to ensure purity. The buffer solution can be
30 exchanged into PBS, and the concentration can be determined by OD₂₈₀ using an extinction coefficient of 1.43. The monoclonal antibodies can be aliquoted and stored at -80° C.

12

Generation of transfectomas producing monoclonal antibodies

Antibodies of the invention also can be produced in a host cell transfectoma using, for example, a combination of recombinant DNA techniques and gene transfection methods as is well known in the art (e.g., Morrison, 1985 Science 229:1202).

For example, to express the antibodies, or antibody fragments thereof, DNAs encoding partial or full-length light and heavy chains, can be obtained by standard molecular biology techniques (e.g., PCR amplification or cDNA cloning using a hybridoma that expresses the antibody of interest) and the DNAs can be inserted into expression vectors such that the genes are operatively linked to transcriptional and translational control sequences. In this context, the term "operatively linked" is intended to mean that an antibody gene is ligated into a vector such that transcriptional and translational control sequences within the vector serve their intended function of regulating the transcription and translation of the antibody gene.

The expression vector and expression control sequences are chosen to be compatible with the expression host cell used. The antibody light chain gene and the antibody heavy chain gene can be inserted into separate vector or, more typically, both genes are inserted into the same expression vector. The antibody genes are inserted into the expression vector by standard methods (e.g., ligation of complementary restriction sites on the antibody gene fragment and vector, or blunt end ligation if no restriction sites are present). The light and heavy chain variable regions of the antibodies described herein can be used to create full-length antibody genes of any antibody isotype by inserting them into expression vectors already encoding heavy chain constant and light chain constant regions of the desired isotype such that the V_H segment is operatively linked to the CH segment(s) within the vector and the V_L segment is operatively linked to the CL segment within the vector. Additionally or alternatively, the recombinant expression vector can encode a signal peptide that facilitates secretion of the antibody chain from a host cell. The antibody chain gene can be cloned into the vector such that the signal peptide is linked in frame to the amino terminus of the antibody chain gene. The signal peptide can be an immunoglobulin signal peptide or a heterologous signal peptide (i.e., a signal peptide from a non-immunoglobulin protein).

5 In addition to the antibody chain genes, the recombinant expression vectors of the invention carry regulatory sequences that control the expression of the antibody chain genes in a host cell. The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and other expression control elements (e.g., polyadenylation signals) that control the transcription or translation of the antibody chain genes. Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel (Gene Expression Technology. 1990 Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences, may depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, etc. Regulatory sequences for mammalian host cell expression include viral elements that direct high levels of protein expression in mammalian cells, such as promoters and/or enhancers derived from cytomegalovirus (CMV), Simian Virus 40 (SV40), adenovirus (e.g., the adenovirus major late promoter (AdMLP)), and polyoma.

10 Alternatively, nonviral regulatory sequences may be used, such as the ubiquitin promoter or P-globin promoter. Still further, regulatory elements composed of sequences from different sources, such as the SRA promoter system, which contains sequences from the SV40 early promoter and the long terminal repeat of human T cell leukemia virus type 1 (Takebe et al., 1988 Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

20 In addition to the antibody chain genes and regulatory sequences, the recombinant expression vectors of the invention may carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells (e.g., origins of replication) and selectable marker genes. The selectable marker gene facilitates selection of host cells into which the vector has been introduced (see, e.g., U.S. Pat. Nos. 4,399,216; 4,634,665; and 5,179,017, all by Axel et al.). For example, typically the selectable marker gene confers resistance to drugs, such as G418, hygromycin or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced. Selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr- host cells with methotrexate selection/amplification) and the neo gene (for G418 selection).

25 30

For expression of the light and heavy chains, the expression vector(s) encoding the heavy and light chains is transfected into a host cell by standard techniques. The various forms of the term "transfection" are intended to encompass a

54

wide variety of techniques commonly used for the introduction of exogenous DNA into a prokaryotic or eukaryotic host cell, e.g., electroporation, calcium-phosphate precipitation, DEAE-dextran transfection and the like. It is theoretically possible to express the antibodies of the invention in either prokaryotic or eukaryotic host cells.

5 Expression of antibodies in eukaryotic cells, in particular mammalian host cells, is discussed because such eukaryotic cells, and in particular mammalian cells, are more likely than prokaryotic cells to assemble and secrete a properly folded and immunologically active antibody. Prokaryotic expression of antibody genes has been reported to be ineffective for production of high yields of active antibody (Boss and
10 Wood, 1985 Immunology Today 6:12-13).

Mammalian host cells for expressing the recombinant antibodies of the invention include Chinese Hamster Ovary (CHO cells) (including dhfr- CHO cells, described Urlaub and Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 used with a DH FR selectable marker, e.g., as described in Kaufman and Sharp, 1982 Mol.
15 Biol. 159:601-621, NSO myeloma cells, COS cells and SP2 cells. In particular, for use with NSO myeloma cells, another expression system is the GS gene expression system shown in WO 87/04462, WO 89/01036 and EP 338,841. When recombinant expression vectors encoding antibody genes are introduced into mammalian host cells, the antibodies are produced by culturing the host cells for a period of time
20 sufficient to allow for expression of the antibody in the host cells or secretion of the antibody into the culture medium in which the host cells are grown. Antibodies can be recovered from the culture medium using standard protein purification methods.

Bispecific molecules

25 In another aspect, the present invention features bispecific molecules comprising a PCSK9 binding molecule (e.g., an anti-PCSK9 antibody, or a fragment thereof), of the invention. A PCSK9 binding molecule of the invention can be derivatized or linked to another functional molecule, e.g., another peptide or protein (e.g., another antibody or ligand for a receptor) to generate a bispecific molecule that
30 binds to at least two different binding sites or target molecules. The PCSK9 binding molecule of the invention may in fact be derivatized or linked to more than one other functional molecule to generate multi-specific molecules that bind to more than two different binding sites and/or target molecules; such multi-specific molecules are also

intended to be encompassed by the term "bispecific molecule" as used herein. To create a bispecific molecule of the invention, an antibody of the invention can be functionally linked (e.g., by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise) to one or more other binding molecules, such as another
5 antibody, antibody fragment, peptide or binding mimetic, such that a bispecific molecule results.

Accordingly, the present invention includes bispecific molecules comprising at least one first binding specificity for PCSK9 and a second binding specificity for a second target epitope.

10 In one embodiment, the bispecific molecules of the invention comprise as a binding specificity at least one antibody, or an antibody fragment thereof, including, e.g., an Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, or a single chain Fv. The antibody may also be a light chain or heavy chain dimer, or any minimal fragment thereof such as a Fv or a single chain construct as described in Ladner et al. U.S. Pat. No. 4,946,778, the contents of
15 which is expressly incorporated by reference.

The bispecific molecules of the present invention can be prepared by conjugating the constituent binding specificities using methods known in the art. For example, each binding specificity of the bispecific molecule can be generated separately and then conjugated to one another. When the binding specificities are
20 proteins or peptides, a variety of coupling or cross-linking agents can be used for covalent conjugation. Examples of cross-linking agents include protein A, carbodiimide, N-succinimidyl-S-acetyl-thioacetate (SATA), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), o-phenylenedimaleimide (oPDM), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), and sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)
25 cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC) (see e.g., Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Other methods include those described in Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78,118-132; Brennan et al., 1985 Science 229:81-83), and Glennie et al., 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375). Conjugating agents are SATA and sulfo-SMCC, both available from Pierce
30 Chemical Co. (Rockford, IL).

When the binding specificities are antibodies, they can be conjugated by sulfhydryl bonding of the C-terminus hinge regions of the two heavy chains. In a

particularly embodiment, the hinge region is modified to contain an odd number of sulfhydryl residues, for example one, prior to conjugation.

Alternatively, both binding specificities can be encoded in the same vector and expressed and assembled in the same host cell. This method is particularly useful where the bispecific molecule is a mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ or ligand x Fab fusion protein. A bispecific molecule of the invention can be a single chain molecule comprising one single chain antibody and a binding determinant, or a single chain bispecific molecule comprising two binding determinants. Bispecific molecules may comprise at least two single chain molecules. Methods for preparing bispecific molecules are described for example in U.S. Pat. Nos. 5,260,203; 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498; and 5,482,858.

Binding of the bispecific molecules to their specific targets can be confirmed by, for example, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (REA), FACS analysis, bioassay (e.g., growth inhibition), or Western Blot assay. Each of these assays generally detects the presence of protein-antibody complexes of particular interest by employing a labeled reagent (e.g., an antibody) specific for the complex of interest.

Functional assays

The functional characteristics of PCSK9 binding molecules can be tested in vitro and in vivo. For example, binding molecules can be tested for the ability to inhibit interaction of PCSK9 with LDL-R, inhibition of PCSK9-dependent effects on LDL-R (e.g., LDL-R mediated uptake of LDL-c), inhibition of PCSK9 proteolytic activity, and decrease LDL-c in vivo.

PCSK9 binding to LDL-R can be detected using Biacore[®] by immobilizing LDL-R to a solid support and detecting soluble PCSK9 binding to the LDL-R. Alternatively, PCSK9 can be immobilized, and LDL-R binding can be detected. PCSK-9/LDL-R binding can also be analyzed by ELISA (e.g., by detecting PCSK9 binding to immobilized LDL-R), or by fluorescence resonance energy transfer (FRET). To perform FRET, fluorophore-labeled PCSK9 binding to LDL-R in solution can be detected (see, for example, U.S. Pat. No. 5,631,169).

PCSK9 binding to LDL-R has been detected by coimmunoprecipitation (Lagace et al., 2006 J. Clin. Inv. 116(11):2995-3005). To examine PCSK9-LDL-R

binding in this manner, HepG2 cells are cultured in sterol-depleted medium for 18 hours. Purified PCSK9 is added to the medium in the presence of 0.1 mM chloroquine and the cells are incubated for one hour. Cells are lysed in mild detergent (1% digitonin w/vol). PCSK9 or LDL-R is immunoprecipitated from cell lysates, separated by SDS-PAGE, and immunoblotted to detect the presence of coimmunoprecipitated LDL-R or PCSK9, respectively (Lagace et al., 2006 J. Clin. Inv. 116(11):2995-3005). These assays may be conducted with a mutant form of PCSK9 that binds to LDL-R with a higher avidity (e.g., hPCSK9 D374Y) (Lagace et al., 2006, supra).

Hepatocytes express LDL-R on the cell surface. Addition of purified PCSK9 to cultured hepatocyte cells (e.g., HepG2 cells, ATCC, HB-8065) produces a decrease in LDL-R expression in a dose- and time-dependent manner (Lagace et al., 2006 J. Clin. Inv. 116(11):2995-3005). PCSK9 binding molecules can be tested for the ability to increase LDL-R levels by hepatocytes. For example, HepG2 cells are cultured in sterol-depleted medium (DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin sulfate, and 1 g/l glucose, 5% (vol/vol) newborn calf lipoprotein-deficient serum (NCLPDS), 10 µM sodium compactin, and 50 µM sodium mevalonate) for 18 hours to induce LDL-R expression. Purified PCSK9 (5 µg/ml) is added to the medium. LDL-R levels in cells harvested at 0, 0.5, 1, 2, and 4 hours after addition of PCSK9 is determined (Lagace et al., 2006 J. Clin. Inv. 116(11):2995-3005). LDL-R levels can be determined by flow cytometry, FRET, immunoblotting, or other means.

LDL-c uptake by cells (e.g., HepG2 cells) can be measured using fluorescently-labeled LDL-c, DiI-LDL (3,3'-dioctadecylindocarbocyanine-low density lipoprotein) as described by Stephan and Yurachek (1993 J. Lipid Res. 34:325-330). Briefly, cells are incubated in culture with DiI-LDL (20-100 µg protein/ml) at 37°C for 2 hours. Cells are washed, lysed, and the concentration of internalized DiI-LDL is quantitated using a spectrofluorometer. LDL-c uptake can be measured in cells contacted with a PCSK9 binding agent (prior to, and/or during the period in which DiI-LDL is present in the cell culture).

PCSK9 proteolytic activity can be measured in vitro using synthetic peptide substrates. See, e.g., Seidah et al., 2003 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(3):928-933. In one exemplary method, purified PCSK9 is incubated at 37°C for 3-18 hours with

50 μ M Suc-RPFHLLVY-MCA (4-methylcoumarin-7-amide) in 25 mM Tris/Mes, pH 7.4 + 2.5 mM CaCl_2 and 0.5% SDS. Fluorescence and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight analysis of the products is used to detect cleavage products (Seidah et al., 2003 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(3):928-933; Basak et al., 2002 FEBS Lett. 514:333-339). This assay may be used to detect differences in cleavage efficiency in the presence of PCSK9 binding molecules.

Transgenic mice overexpressing human PCSK9 in liver have increased levels of plasma LDL-c relative to non-transgenic mice (Lagace et al., 2006 J. Clin. Inv. 116(11):2995-3005). See also Maxwell and Breslow, 2004 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:7100, describing overexpression of PCSK9 using an adenovirus vector in mice. PCSK9^{-/-} mice have been produced (Rashid et al., 2005 Proc. Natl. Acad. Sci. 102(5):5374-5379). These mice can be genetically modified to express a hPCSK9 transgene. PCSK9 binding molecules can be tested in any of these models, or in animals which are not genetically modified, for the ability to clear or reduce total cholesterol and/or LDL-c.

The kinetics of LDL clearance from plasma can be determined by injecting animals with [¹²⁵I]-labelled LDL, obtaining blood samples at 0, 5, 10, 15, and 30 minutes after injection, and quantitating [¹²⁵I]-LDL in the samples (Rashid et al., 2005 Proc. Natl. Acad. Sci. 102(5):5374-5379). The rate of LDL clearance is increased in PCSK9^{-/-} mice relative to wild type mice (Rashid et al., 2005 supra). Increased LDL clearance in animals administered a PCSK9 binding molecule indicates that the agent inhibits PCSK9 activity in vivo.

Decreases in total plasma cholesterol, plasma triglycerides, or LDL-c in response to treatment with a PCSK9 binding molecule are indicative of therapeutic efficacy of the PCSK9 binding molecule. Cholesterol and lipid profiles can be determined by colorimetric, gas-liquid chromatographic, or enzymatic means using commercially available kits.

Pharmaceutical compositions

In another aspect, the present invention provides a composition, e.g., a pharmaceutical composition, containing one or a combination of PCSK9 binding molecules (e.g., monoclonal antibodies, or antigen-binding portion(s) thereof), of the present invention, formulated together with a pharmaceutically acceptable carrier.

Such compositions may include one or a combination of (e.g., two or more different) binding molecules. For example, a pharmaceutical composition of the invention can comprise a combination of antibodies or agents that bind to different epitopes on the target antigen or that have complementary activities.

5 Pharmaceutical compositions of the invention also can be administered in combination therapy, i.e., combined with other agents. For example, the combination therapy can include an anti-PCSK9 antibody combined with at least one other cholesterol-reducing agent. Examples of therapeutic agents that can be used in combination therapy are described in greater detail below in the section on uses of the
10 agents of the invention.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. The carrier should be suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous, parenteral,
15 spinal or epidermal administration (e.g., by injection or infusion). Depending on the route of administration, the active compound may be coated in a material to protect the compound from the action of acids and other natural conditions that may inactivate the compound.

The pharmaceutical compounds of the invention may include one or more
20 pharmaceutically acceptable salts. A "pharmaceutically acceptable salt" refers to a salt that retains the desired biological activity of the parent compound and does not impart any undesired toxicological effects (see e.g., Berge, S.M., et al., 1977 J. Pharm. Sci. 66:1-19). Examples of such salts include acid addition salts and base addition salts. Acid addition salts include those derived from nontoxic inorganic
25 acids, such as hydrochloric, nitric, phosphoric, sulfuric, hydrobromic, hydroiodic, phosphorous and the like, as well as from nontoxic organic acids such as aliphatic mono- and di-carboxylic acids, phenyl-substituted alkanoic acids, hydroxy alkanoic acids, aromatic acids, aliphatic and aromatic sulfonic acids and the like. Base addition salts include those derived from alkaline earth metals, such as sodium, potassium,
30 magnesium, calcium and the like, as well as from nontoxic organic amines, such as N,N'-dibenzylethylenediamine, N-methylglucamine, chlorprocaine, choline, diethanolamine, ethylenediamine, procaine and the like.

60

A pharmaceutical composition of the invention also may include a pharmaceutically acceptable anti-oxidant. Examples of pharmaceutically acceptable antioxidants include: water soluble antioxidants, such as ascorbic acid, cysteine hydrochloride, sodium bisulfate, sodium metabisulfite, sodium sulfite and the like; oil-soluble antioxidants, such as ascorbyl palmitate, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), lecithin, propyl gallate, alpha-tocopherol, and the like; and metal chelating agents, such as citric acid, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sorbitol, tartaric acid, phosphoric acid, and the like.

Examples of suitable aqueous and nonaqueous carriers that may be employed in the pharmaceutical compositions of the invention include water, ethanol, polyols (such as glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof, vegetable oils, such as olive oil, and injectable organic esters, such as ethyl oleate. Proper fluidity can be maintained, for example, by the use of coating materials, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions, and by the use of surfactants.

These compositions may also contain adjuvants such as preservatives, wetting agents, emulsifying agents and dispersing agents. Prevention of presence of microorganisms may be ensured both by sterilization procedures, supra, and by the inclusion of various antibacterial and antifungal agents, for example, paraben, chlorobutanol, phenol sorbic acid, and the like. It may also be desirable to include isotonic agents, such as sugars, sodium chloride, and the like into the compositions. In addition, prolonged absorption of the injectable pharmaceutical form may be brought about by the inclusion of agents which delay absorption such as, aluminum monostearate and gelatin.

Pharmaceutically acceptable carriers include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the pharmaceutical compositions of the invention is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

Therapeutic compositions typically must be sterile and stable under the conditions of manufacture and storage. The composition can be formulated as a

61

solution, microemulsion, liposome, or other ordered structure suitable to high drug concentration. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity
5 can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. In many cases, one can include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by
10 including in the composition an agent that delays absorption for example, monostearate salts and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by sterilization microfiltration.
15 Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying (lyophilization) that yield a powder of the active ingredient
20 plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

The amount of active ingredient which can be combined with a carrier material to produce a single dosage form will vary depending upon the subject being treated, and the particular mode of administration. The amount of active ingredient
25 which can be combined with a carrier material to produce a single dosage form will generally be that amount of the composition which produces a therapeutic effect. Generally, out of one hundred percent, this amount will range from about 0.01 per cent to about ninety-nine percent of active ingredient, from about 0.1 per cent to about 70 per cent, or from about 1 percent to about 30 percent of active ingredient in
30 combination with a pharmaceutically acceptable carrier.

Dosage regimens are adjusted to provide the optimum desired response (e.g., a therapeutic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally

reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subjects to be

5 treated; each unit contains a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of

10 compounding such an active compound for the treatment of sensitivity in individuals.

For administration of the antibody, the dosage ranges from about 0.0001 to 100 mg/kg, and more usually 0.01 to 5 mg/kg, of the host body weight. For example dosages can be 0.3 mg/kg body weight, 1 mg/kg body weight, 3 mg/kg body weight, 5

15 mg/kg body weight or 10 mg/kg body weight or within the range of 1-10 mg/kg. An exemplary treatment regime entails administration once per week, once every two weeks, once every three weeks, once every four weeks, once a month, once every 3 months or once every three to 6 months. Dosage regimens for PCSK9 binding molecule of the invention include 1 mg/kg body weight or 3 mg/kg body weight by intravenous administration, with the antibody being given using one of the following

20 dosing schedules: every four weeks for six dosages, then every three months; every three weeks; 3 mg/kg body weight once followed by 1 mg/kg body weight every three weeks.

In some methods, two or more binding molecules (e.g., monoclonal antibodies) with different binding specificities are administered simultaneously, in

25 which case the dosage of each antibody administered falls within the ranges indicated. The PCSK9 binding molecule is usually administered on multiple occasions. Intervals between single dosages can be, for example, weekly, monthly, every three months or yearly. Intervals can also be irregular as indicated by measuring blood levels of binding molecule to PCSK9 in the patient. In some methods, dosage is

30 adjusted to achieve a plasma concentration of the PCSK9 binding molecule of about 1-1000 $\mu\text{g/ml}$ and in some methods about 25-300 $\mu\text{g/ml}$.

Alternatively, a PCSK9 binding molecule can be administered as a sustained release formulation, in which case less frequent administration is required. Dosage

and frequency vary depending on the half-life of the PCSK9 binding molecule in the patient. In general, human antibodies show the longest half-life, followed by humanized antibodies, humanized antibodies, chimeric antibodies, and nonhuman antibodies. The dosage and frequency of administration can vary depending on whether the treatment is prophylactic or therapeutic. In prophylactic applications, a relatively low dosage is administered at relatively infrequent intervals over a long period of time. Some patients continue to receive treatment for the rest of their lives. In therapeutic applications, a relatively high dosage at relatively short intervals is sometimes required until progression of the disease is reduced or terminated or until the patient shows partial or complete amelioration of symptoms of disease. Thereafter, the patient can be administered a prophylactic regime.

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

A "therapeutically effective dosage" of PCSK9 binding molecule of the invention can result in a decrease in severity of disease symptoms (e.g., a decrease in plasma cholesterol, or a decrease in a symptom of a cholesterol-related disorder), an increase in frequency and duration of disease symptom-free periods, or a prevention of impairment or disability due to the disease affliction.

A composition of the present invention can be administered by one or more routes of administration using one or more of a variety of methods known in the art. As will be appreciated by the skilled artisan, the route and/or mode of administration will vary depending upon the desired results. Routes of administration for PCSK9 binding molecules of the invention include intravenous, intramuscular, intradermal,

64

intra-peritoneal, subcutaneous, spinal or other parenteral routes of administration, for example by injection or infusion. The phrase "parenteral administration" as used herein means modes of administration other than enteral and topical administration, usually by injection, and includes, without limitation, intravenous, intramuscular, 5 intraarterial, intrathecal, intracapsular, intraorbital, intracardiac, intradermal, intra-peritoneal, transtracheal, subcutaneous, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subarachnoid, intraspinal, epidural and intrasternal injection and infusion.

Alternatively, a PCSK9 binding molecule of the invention can be administered by a nonparenteral route, such as a topical, epidermal or mucosal route of 10 administration, for example, intranasally, orally, vaginally, rectally, sublingually or topically.

The active compounds can be prepared with carriers that will protect the compound against rapid release, such as a controlled release formulation, including implants, transdermal patches, and microencapsulated delivery systems. 15 Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Many methods for the preparation of such formulations are patented or generally known to those skilled in the art. See, e.g., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

20 Therapeutic compositions can be administered with medical devices known in the art. For example, in one embodiment, a therapeutic composition of the invention can be administered with a needleless hypodermic injection device, such as the devices shown in U.S. Pat. Nos. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 or 4,596,556. Examples of well known implants and modules 25 useful in the present invention include: U.S. Pat. No. 4,487,603, which shows an implantable micro-infusion pump for dispensing medication at a controlled rate; U.S. Pat. No. 4,486,194, which shows a therapeutic device for administering medicants through the skin; U.S. Pat. No. 4,447,233, which shows a medication infusion pump for delivering medication at a precise infusion rate; U.S. Pat. No. 4,447,224, which 30 shows a variable flow implantable infusion apparatus for continuous drug delivery; U.S. Pat. No. 4,439,196, which shows an osmotic drug delivery system having multi-chamber compartments; and U.S. Pat. No. 4,475,196, which shows an osmotic drug

delivery system. These patents are incorporated herein by reference. Many other such implants, delivery systems, and modules are known to those skilled in the art.

In certain embodiments, the PCSK9 binding molecules of the invention can be formulated to ensure proper distribution in vivo. For example, the blood-brain barrier (BBB) excludes many highly hydrophilic compounds. To ensure that the therapeutic compounds of the invention cross the BBB (if desired), they can be formulated, for example, in liposomes. For methods of manufacturing liposomes, see, e.g., U.S. Pat. Nos. 4,522,811; 5,374,548; and 5,399,331. The liposomes may comprise one or more moieties which are selectively transported into specific cells or organs, thus enhance targeted drug delivery (see, e.g., V.V. Ranade, 1989 J. Cline Pharmacol. 29:685). Exemplary targeting moieties include folate or biotin (see, e.g., U.S. Pat. 5,416,016 to Low et al.); mannosides (Umezawa et al., 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); antibodies (P.G. Bloeman et al., 1995 FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al., 1995 Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); surfactant protein A receptor (Briscoe et al., 1995 Am. J. Physiol. 123:134); p120 (Schreier et al., 1994 J. Biol. Chem. 269:9090); see also K. Keinänen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273.

Uses and methods of the invention

The PCSK9 binding molecules described herein have in vitro and in vivo diagnostic and therapeutic utilities. For example, these molecules can be administered to cells in culture, e.g. in vitro or in vivo, or in a subject, e.g., in vivo, to treat, prevent or diagnose a variety of disorders. PCSK9 binding molecules are particularly suitable for treating human patients having, or at risk for, elevated cholesterol or a condition associated with elevated cholesterol, e.g., a lipid disorder (e.g., hyperlipidemia, type I, type II, type III, type IV, or type V hyperlipidemia, secondary hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, xanthomatosis, cholesterol acetyltransferase deficiency). PCSK9 binding molecules are also suitable for treating human patients having, atherosclerotic conditions (e.g., atherosclerosis), coronary artery disease, cardiovascular disease, and patients at risk for these disorders, e.g., due to the presence of one or more risk factors (e.g., hypertension, cigarette smoking, diabetes, obesity, or hyperhomocysteinemia).

When PCSK9 binding molecules are administered together with another agent, the two can be administered sequentially in either order or simultaneously. In some embodiments, a PCSK9 binding molecule is administered to a subject who is also receiving therapy with a second agent (e.g., a second cholesterol-reducing agent).

5 Cholesterol reducing agents include statins, bile acid sequestrants, niacin, fibric acid derivatives, and long chain alpha, omega-dicarboxylic acids. Statins inhibit cholesterol synthesis by blocking HMGCoA, a key enzyme in cholesterol biosynthesis. Examples of statins are lovastatin, pravastatin, atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, and simvastatin. Bile acid sequestrants interrupt the recycling of bile
10 acids from the intestine to the liver. Examples of these agents are cholestyramine and colestipol hydrochloride. Examples of fibric acid derivatives are clofibrate and gemfibrozil. Long chain alpha, omega-dicarboxylic acids are described, e.g., by Bisgaier et al., 1998, J. Lipid Res. 39:17-30; WO 98/30530; U.S. Pat. No. 4,689,344; WO 99/00116; U.S. Pat. No. 5,756,344; U.S. Pat. No. 3,773,946; U.S. Pat. No.
15 4,689,344; U.S. Pat. No. 4,689,344; U.S. Pat. No. 4,689,344; and U.S. Pat. No. 3,930,024; ethers (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,711,896; U.S. Pat. No. 5,756,544; U.S. Pat. No. 6,506,799). Phosphates of dolichol (U.S. Pat. No. 4,613,593), and azolidinedione derivatives (U.S. Pat. No. 4,287,200) can also be used to reduce cholesterol levels.

20 A combination therapy regimen may be additive, or it may produce synergistic results (e.g., reductions in cholesterol greater than expected for the combined use of the two agents). In some embodiments, combination therapy with a PCSK9 binding molecule and a statin produces synergistic results (e.g., synergistic reductions in cholesterol). In some subjects, this can allow reduction in statin dosage to achieve the
25 desired cholesterol levels.

PCSK9 binding molecules are useful for subjects who are intolerant to therapy with another cholesterol-reducing agent, or for whom therapy with another cholesterol-reducing agent has produced inadequate results (e.g., subjects who experience insufficient LDL-c reduction on statin therapy).

30 A PCSK9 binding molecule described herein can be administered to a subject with elevated cholesterol (e.g., a human subject with total plasma cholesterol levels of 200 mg/dl or greater, a human subject with LDL-c levels of 160 mg/dl or greater).

67

In one embodiment, the binding molecules of the invention can be used to detect levels of PCSK9. This can be achieved, for example, by contacting a sample (such as an in vitro sample) and a control sample with the PCSK9 binding molecule under conditions that allow for the formation of a complex between the binding
5 molecule and PCSK9. Any complexes formed between the molecule and PCSK9 are detected and compared in the sample and the control. For example, standard detection methods, well known in the art, such as ELISA and flow cytometric assays, can be performed using the compositions of the invention.

Accordingly, in one aspect, the invention further provides methods for
10 detecting the presence of PCSK9 (e.g., hPCSK9) in a sample, or measuring the amount of PCSK9, comprising contacting the sample, and a control sample, with a PCSK9 binding molecule (e.g., an antibody) of the invention, under conditions that allow for formation of a complex between the antibody or portion thereof and PCSK9. The formation of a complex is then detected, wherein a difference in complex
15 formation between the sample compared to the control sample is indicative of the presence of PCSK9 in the sample.

Also within the scope of the invention are kits consisting of the compositions of the invention and instructions for use. The kit can further contain a least one additional reagent, or one or more additional antibodies of the invention (e.g., an
20 antibody having a complementary activity which binds to an epitope on the target antigen distinct from the first antibody). Kits typically include a label indicating the intended use of the contents of the kit. The term label includes any writing, or recorded material supplied on or with the kit, or which otherwise accompanies the kit.

The invention having been fully described, it is further illustrated by the
25 following examples and claims, which are illustrative and are not meant to be further limiting. Those skilled in the art will recognize or be able to ascertain using no more than routine experimentation, numerous equivalents to the specific procedures described herein. Such equivalents are within the scope of the present invention and claims. The contents of all references, including issued patents and published patent
30 applications, cited throughout this application are hereby incorporated by reference.

62

EXAMPLES

Example 1. Generation of human antibodies by phage display

For the generation of antibodies against hPCSK9, selections with the MorphoSys HuCAL GOLD[®] phage display library are carried out. HuCAL GOLD[®] is a Fab library based on the HuCAL[®] concept in which all six CDRs are diversified, and which employs the CysDisplay[™] technology for linking Fab fragments to the phage surface (Knappik et al., 2000 J.Mol. Biol. 296:57-86; Krebs et al., 2001 J Immunol. Methods 254:67-84; Rauchenberger et al., 2003 J Biol Chem. 278(40):38194-38205; WO 01/05950, Löhning, 2001).

Phagemid rescue, phage amplification, and purification

The HuCAL GOLD[®] library is amplified in 2xYT medium containing 34 µg/ml chloramphenicol and 1% glucose (2xYT-CG). After infection with hyperphage helper phages at an OD_{600nm} of 0.5 (30 min at 37°C without shaking; 30 min at 37°C shaking at 250 rpm), cells are spun down (4120 g; 5 min; 4°C), resuspended in 2xYT/ 34 µg/ml chloramphenicol/ 50 µg/ml kanamycin/ 0.25 mM IPTG and grown overnight at 22°C. Phages are PEG-precipitated twice from the supernatant, resuspended in PBS/ 20% glycerol and stored at -80°C.

Phage amplification between two panning rounds is conducted as follows: mid-log phase *E. coli* TG1 cells are infected with eluted phages and plated onto LB-agar supplemented with 1% of glucose and 34 µg/ml of chloramphenicol (LB-CG plates). After overnight incubation at 30°C, the TG1 colonies are scraped off the agar plates and used to inoculate 2xYT-CG until an OD_{600nm} of 0.5 is reached and hyperphage helper phages added for infection as described above.

Pannings with HuCAL GOLD[®]

For the selection of antibodies recognizing hPCSK9 two different panning strategies were applied. In summary, HuCAL GOLD[®] phage-antibodies are divided into four pools comprising different combinations of VH master genes (pool 1: VH1/5 λκ, pool 2: VH3 λκ, pool 3: VH2/4/6 λκ, pool 4: VH1-6 λκ). These pools are individually subjected to three rounds of solid phase panning on human hPCSK9 directly coated to Maxisorp plates and in addition three of solution pannings on biotinylated hPCSK9.

69

The first panning variant is solid phase panning against hPCSK9: 2 wells on a Maxisorp plate (F96 Nunc-Immunoplate) are coated with 300 μ l of 5 μ g/ml hPCSK9- each o/n at 4°C. The coated wells are washed 2x with 350 μ l PBS and blocked with 350 μ l 5% MPBS for 2h at RT on a microtiter plate shaker. For each panning about
5 10^{13} HuCAL GOLD[®] phage-antibodies are blocked with equal volume of PBST/5% MP for 2h at room temperature. The coated wells are washed 2x with 350 μ l PBS after the blocking. 300 μ l of pre-blocked HuCAL GOLD[®] phage-antibodies are added to each coated well and incubated for 2h at RT on a shaker. Washing is performed by adding five times 350 μ l PBS/0.05% Tween, followed by washing another four times
10 with PBS. Elution of phage from the plate is performed with 300 μ l 20mM DTT in 10mM Tris/HCl pH8 per well for 10 min. The DTT phage eluate is added to 14 ml of *E.coli* TG1, which are grown to an OD₆₀₀ of 0.6-0.8 at 37°C in 2YT medium and incubated in 50ml plastic tubes for 45min at 37°C without shaking for phage infection. After centrifugation for 10 min at 5000rpm, the bacterial pellets are each
15 resuspended in 500 μ l 2xYT medium, plated on 2xYT-CG agar plates and incubated overnight at 30°C. Colonies are then scraped from the plates and phages were rescued and amplified as described above. The second and third rounds of the solid phase panning on directly coated hPCSK9 is performed according to the protocol of the first round, but with increased stringency in the washing procedure.

The second panning variant is solution panning against biotinylated human hPCSK9: For the solution panning, using biotinylated hPCSK9 coupled to Dynabeads M-280 (Dyna), the following protocol is applied: 1.5 ml Eppendorf tubes are blocked with 1.5 ml 1% bovine serum albumin in PBS over night at 4°C. 200 μ l streptavidin coated magnetic Dynabeads M-280 (Dyna) are washed 1x with 200 μ l PBS and
25 resuspended in 200 μ l 1xChemiblocker (diluted in 1x PBS). Blocking of beads is performed in pre-blocked tubes over night at 4°C. Phages diluted in 500 μ l PBS for each panning condition are mixed with 500 μ l 2xChemiblocker / 0.1% Tween 1 h at RT (rotator). Pre-adsorption of phages is performed twice: 50 μ l of blocked Streptavidin magnetic beads are added to the blocked phages and incubated for 30
30 min at RT on a rotator. After separation of beads via a magnetic device (Dyna MPC-E) the phage supernatant (~1ml) is transferred to a new blocked tube and pre-adsorption was repeated on 50 μ l blocked beads for 30 min. Then, 200 nM biotinylated hPCSK9 is added to blocked phages in a new blocked 1.5 ml tube and

incubated for 1 h at RT on a rotator. 100 µl of blocked streptavidin magnetic beads is added to each panning phage pool and incubated 10 min at RT on a rotator. Phages bound to biotinylated hPCSK9 are immobilized to the magnetic beads and collected with a magnetic particle separator (DynaL MPC-E). Beads are then washed 7x in
5 PBS/0.05% Tween using a rotator, followed by washing another three times with PBS. Elution of phage from the Dynabeads is performed adding 300 µl 20 mM DTT in 10 mM Tris/HCl pH 8 to each tube for 10 min. Dynabeads are removed by the magnetic particle separator and the supernatant is added to 14ml of an *E. coli* TG-1 culture grown to OD_{600nm} of 0.6-0.8. Beads are then washed once with 200µl PBS and
10 together with additionally removed phages the PBS was added to the 14 ml *E. coli* TG-1 culture. For phage infection, the culture is incubated in 50 ml plastic tubes for 45 min at 37°C without shaking. After centrifugation for 10 min at 5000 rpm, the bacterial pellets are each resuspended in 500 µl 2xYT medium, plated on 2xYT-CG agar plates and incubated overnight at 30 °C. Colonies are then scraped from the
15 plates, and phages are rescued and amplified as described above.

The second and third rounds of the solution panning on biotinylated hPCSK9 are performed according to the protocol of the first round, except with increased stringency in the washing procedure.

20 *Subcloning and expression of soluble Fab fragments*

The Fab-encoding inserts of the selected HuCAL GOLD[®] phagemids are subcloned into the expression vector pMORPH[®]X9_Fab_FH to facilitate rapid and efficient expression of soluble Fabs. For this purpose, the plasmid DNA of the selected clones is digested with *Xba*I and *Eco*RI, thereby excising the Fab-encoding
25 insert (ompA-VLCL and phoA-Fd), and cloned into the *Xba*I/*Eco*RI-digested expression vector pMORPH[®]X9_Fab_FH. Fabs expressed from this vector carry two C-terminal tags (FLAG[™] and 6xHis, respectively) for both, detection and purification.

30 *Microexpression of HuCAL GOLD[®] Fab antibodies in E. coli*

Chloramphenicol-resistant single colonies obtained after subcloning of the selected Fabs into the pMORPH[®]X9_Fab_FH expression vector are used to inoculate the wells of a sterile 96-well microtiter plate containing 100 µl 2xYT-CG medium per

well and grown overnight at 37°C. 5 µl of each *E. coli* TG-1 culture is transferred to a fresh, sterile 96-well microtiter plate pre-filled with 100 µl 2xYT medium supplemented with 34 µg/ml chloramphenicol and 0.1% glucose per well. The microtiter plates are incubated at 30°C shaking at 400 rpm on a microplate shaker
5 until the cultures are slightly turbid (~2-4 hrs) with an OD_{600nm} of ~0.5.

To these expression plates, 20 µl 2xYT medium supplemented with 34 µg/ml chloramphenicol and 3 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) is added per well (end concentration 0.5 mM IPTG), the microtiter plates are sealed with a gas-permeable tape, and the plates are incubated overnight at 30°C shaking at 400 rpm.

10 Generation of whole cell lysates (BEL extracts): Bacterial cells pellets were frozen on dry ice and then resuspended in PBS containing 1 mg/ml lysozyme, 2 mM MgCl₂ and benzonase and incubated for 1 hour on shaker. Lysates were blocked by the addition of 1% final concentration BSA and cleared lysates were added to appropriately coated ELISA plates to assess binding to PCSK9. The BEL extracts
15 were used for binding analysis by ELISA.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Techniques

5 µg/ml of human recombinant hPCSK9 in PBS is coated onto 384 well Maxisorp plates (Nunc-Immunoplate) o/n at 4°C. After coating, the wells are washed
20 once with PBS / 0.05 % Tween (PBS-T) and 2x with PBS. Then the wells are blocked with PBS-T with 2% BSA for 2 h at RT. In parallel, 15 µl BEL extract and 15 µl PBS-T with 2% BSA are incubated for 2 h at RT. The blocked Maxisorp plated are washed 3x with PBS-T before 10 µl of the blocked BEL extracts are added to the wells and incubated for 1 h at RT. For detection of the primary Fab antibodies, the
25 following secondary antibodies are applied: alkaline phosphatase (AP)-conjugated AffiniPure F(ab')₂ fragment, goat anti-human, -anti-mouse or -anti-sheep IgG (Jackson Immuno Research). For the detection of AP-conjugates fluorogenic substrates like AttoPhos (Roche) are used according to the instructions by the manufacturer. Between all incubation steps, the wells of the microtiter plate are
30 washed with PBS-T three times and three times after the final incubation with secondary antibody. Fluorescence can be measured using Thermo Multiskan plate reader.

Expression of HuCAL GOLD® Fab antibodies in E. coli and purification

Expression of Fab fragments encoded by pMORPH®X9_Fab_FH in TG-1 cells is carried out in shaker flask cultures using 750 ml of 2xYT medium supplemented with 34 µg/ml chloramphenicol. Cultures are shaken at 30°C until the OD_{600nm} reaches 0.5. Expression is induced by addition of 0.75 mM IPTG for 20 h at 30°C. Cells are disrupted using lysozyme and Fab fragments isolated by Ni-NTA chromatography (Qiagen, Hilden, Germany). Protein concentrations can be determined by UV-spectrophotometry (Krebs et al. J Immunol Methods 254, 67-84 (2001)).

Example 2: Affinity maturation of selected anti-PCSK9 Fabs by parallel exchange of LCDR3 and HCDR2 cassettes*Generation of Fab libraries for affinity maturation*

In order to increase the affinity and inhibitory activity of the identified anti-PCSK9 antibodies, Fab clones are subjected to affinity maturation. For this purpose, CDR regions are optimized by cassette mutagenesis using trinucleotide directed mutagenesis (Virnekas et al. Nucleic Acids Res 22, 5600-5607, 1994).

The following paragraph briefly describes a protocol that can be used for cloning of the maturation libraries and Fab optimization. Fab fragments from expression vector pMORPH®X9_Fab_FH are cloned into the phagemid vector pMORPH®25 (U.S. Pat. No. 6,753,136). Two different strategies are applied in parallel to optimize both, the affinity and the efficacy of the parental Fabs.

Phage antibody Fab libraries are generated where the LCDR3 of six selected maturation candidates ("parental" clones) is replaced by a repertoire of individual light chain CDR3 sequences. In parallel, the HCDR2 region of each parental clone is replaced by a repertoire of individual heavy chain CDR2 sequences. Affinity maturation libraries are generated by standard cloning procedures and transformation of the diversified clones into electro-competent *E. coli* TOP10F' cells (Invitrogen). Fab-presenting phages are prepared as described in Example 1. Maturation pools corresponding to each library are built and kept separate during the subsequent selection process.

Maturation panning strategies

Pannings using the four antibody pools are performed on biotinylated recombinant hPCSK9 in solution for three rounds, respectively as described in Example 1, solution panning against biotinylated hPCSK9. The selection stringency is increased by reduction of biotinylated antigen from panning round to panning round, by prolonged washing steps and by addition of non-biotinylated antigen for off-rate selection.

Electrochemiluminescence (BioVeris) based binding analysis for detection of hPCSK9 binding Fab in bacterial lysates

Binding of optimized Fab antibodies in *E. coli* lysates (BEL extracts) to hPCSK9 is analyzed in BioVeris M-SERIES® 384 Analyzer (BioVeris, Europe, Witney, Oxfordshire, UK). BEL extracts are diluted in assay buffer (PBS/0,05%Tween20/0.5%BSA) for use in BioVeris screening. Biotinylated hPCSK9 is coupled to streptavidin coated paramagnetic beads, Anti-human (Fab)₂ (Dianova) was ruthenium labeled using the BV-tagTM (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK). This secondary antibody is added to the hPCSK9 coupled beads before measuring in the BioVeris M-SERIES® 384 Analyzer. Sequence analysis of hits from the BioVeris screening is conducted to identify Fab clones. Selected Fab antibodies are sub-cloned into IgG1 format.

Determination of picomolar affinities using Solution Equilibrium Titration (SET)

For K_D determination, monomer fractions (at least 90% monomer content, analyzed by analytical SEC; Superdex75, Amersham Pharmacia) of Fab are used. Electrochemiluminescence (ECL) based affinity determination in solution and data evaluation can be performed essentially as described by Haenel et al., 2005. A constant amount of Fab is equilibrated with different concentrations (serial 3ⁿ dilutions) of recombinant hPCSK9 in solution. Biotinylated hPCSK9 coupled to paramagnetic beads (M-280 Streptavidin, Dynal), and BV-tagTM (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) labeled anti-human (Fab)₂ (Dianova) is added and the mixture incubated for 30 min. Subsequently, the concentration of unbound Fab is quantified via ECL detection using the M-SERIES® 384 analyzer (BioVeris Europe).

74

Affinity determination to PCSK9 of another species (e.g., chimpanzee or cynomolgus) in solution is done essentially as described above, replacing the human PCSK9 with the chimpanzee or cynomolgus PCSK9. For detection of free Fab, biotinylated hPCSK9 coupled to paramagnetic beads is used. Affinities are calculated according to Haenel et al. (2005 Anal Biochem 339, 182-184).

Example 3. Generation of Anti-PCSK9 Fab by Phage Display

Anti-PCSK9 Fab was generated using the following phage display techniques. Purified human PCSK9 was labeled with PEO4 biotin (Pierce, 21329) using the manufacturer's protocol using a 20:1 molar ratio of biotin: PCSK9. Low molar ratios ensure limited modification of the protein being labeled and the choice of the PEO4 linker separates the biotin moiety from the protein and enhances the overall hydrophilicity of the biotinylated protein. Biotinylated human PCSK9 was used to coat Dynal M280 streptavidin beads and the Morphosys Hucal library was panned for 3 rounds using standard panning techniques. After three iterative rounds of panning, the pooled round 3 plasmid DNA was purified and digested with restriction enzymes EcoRI and XbaI. Plasmid DNA was separated by agarose gel electrophoresis and the 1.5 kB insert containing two gene segments (immunoglobulin heavy chain (VH/CH) and light chain (VL/CL)) was excised and purified. This 1.5 kB fragment (Fab insert) was subcloned into the Morphosys expression vector pMORPHX9_FH and transformed into electrocompetent TG-1 cells. Individual colonies were picked and master plates were prepared. Daughter plates inoculated from the master plates were re-grown in low glucose media and Fab expression was induced by culture in the presence of IPTG overnight. Cell pellets were frozen, lysed with lysozyme and cleared lysates were evaluated by ELISA on plates coated with PEO-biotinylated PCSK9 coated on neutravidin-coated wells (negative controls neutravidin alone). ELISA positives were retested following restreaking of master plate onto agar plates and picking of 3 individual colonies for retesting. Plasmid DNA from PCSK9 clones was also prepared for DNA sequencing. Fab protein from unique clones was prepared in liter scale cultures induced with IPTG and then purified sequentially by IMAC and size exclusion chromatography. Protein concentrations were determined by Bradford assay coupled with SDS-PAGE.

70

Example 4: PCSK9 Competitive ELISA

Purified human PCSK9 labeled with NHS-PEO4-biotin (Pierce, 21329) was used to coat neutravidin-coated Nunc Maxisorp plates. Following the blocking of non-specific binding with BSA, PCSK9 coated wells were incubated first with a saturating concentration of an anti-human PCSK9 Fab (positive control Fab) or with buffer alone. Following binding of the positive control Fab (or buffer alone), alternate anti-human PCSK9 Fabs (test Fab) were added to both buffer alone and anti-human PCSK9 Fab treated wells. After incubation and wash steps, antibody fragments bound to plate-bound human PCSK9 were detected using a cocktail of peroxidase-conjugated, goat anti-human light chain antibodies with 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate. Fabs that compete for similar or overlapping binding sites on human PCSK9 fail to elicit additional binding signals (i.e. binding competition for similar or overlapping sites on human PCSK9) compared to positive control Fab alone. Alternatively, Fabs that bind independently of the positive control Fab exhibit increased binding signals as reflected by increased levels of TMB substrate conversion (i.e. non-competitive binding of Fabs to human PCSK9). Using this strategy, Fabs were grouped based on ability of members to block each others' binding to human PCSK9. Initial characterization with H1-anti-PCSK9-Fab as the positive control Fab divided the antibodies into two groups: inhibited by H1 (group 1) or not inhibited by H1 (group 2). Further binding competition experiments demonstrated that Fabs within each group inhibited the binding of other members of that group. From these studies, a third group of Fabs (group 3) was identified by virtue of non-competition with either group 1 or group 2 Fabs. Fab grouping was utilized as a guide to determine which of the anti-PCSK9 Fabs to characterize for binding affinity, ability to disrupt the hPCSK9/LDL-R, and the effects on HepG2 cells. The precise binding site on human PCSK9 of Fabs with desired properties in vitro, such as H1, were then mapped using biophysical techniques such as DXMS, as illustrated in Example 4.

Example 5: Functional Analysis of Anti-PCSK9 Fab

In this example, the functional properties of the H1-anti-PCSK9 Fab were examined, including binding affinity, ability to disrupt the hPCSK9/LDL-R, and the effects on HepG2 cells.

Jb

1. Binding Affinity

Biacore binding assays were performed at 25 °C on a T100 instrument. HBS-P+Ca (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.005% P-20, 2 mM CaCl₂) was used as the running buffer. For immobilization, hPCSK9 was diluted in to pH 5.5 acetate buffer at 30 µg/mL right before use. About 200 RU of hPCSK9 was immobilized on a CM5 sensor chip (S Series) following the standard amine coupling protocol. Fab solutions (0 – 20 nM, diluted in the running buffer) were injected over the PCSK9 and reference surface (blank amine coupling) at a flow rate of 30 µl/min. PCSK9 surface was regenerated with a 60 second injection of 1 mM NaOH and 1 M NaCl.

All data analysis were done using the BIAevaluation software. Binding curves were double-reference corrected, first with the binding curve from the reference cell, followed the binding curve from the blank of the running buffer. Then the data was analyzed globally with a 1:1 binding model to extract binding constant K_D (nM), association (k_a , 1/Ms), and dissociation rate constant (k_d , 1/s).

It was determined that H1-Fab exhibited a k_a of 3.23×10^5 (1/Ms), k_d of 3.41×10^{-3} (1/s), and K_D of 1.05×10^{-8} M (Figure 3).

2. Ability of H1-Anti-PCSK9 Fab to Disrupt hPCSK9/LDL-R

A PCSK9/LDL-R FRET disruption assay was performed as follows to assess the ability of H1-Fab to disrupt the hPCSK9/LDL-R interaction. LDL-R extracellular domain (Ala 22-Arg 788) (R&D Systems) was labeled with europium cryptate (LDL-R-Eu) (Perkin Elmer) and PCSK9 purified protein was labeled with Alexa Fluor 647 (PCSK9-Alexa) (Invitrogen). The assay buffer consisted of 20 mM HEPES (pH 7.0), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0.1% Tween 20, and 1 mg/ml BSA. The Fab was pre-incubated with PCSK9-Alexa at room temperature for 30 minutes before LDL-R-Eu was added. The final concentration of PCSK9-Alexa and LDL-R-Eu was 8 nM and 1nM, respectively. After two hours incubation, the plate was read on Envision (Perkin Elmer) with the following settings: excitation at 330 nm and emissions at both 620 nm and 665 nm, 100 µs delay between excitation and readings. The ratio of reading a 665 nm over reading at 620 nm is normalized and reported in Figure 4.

As shown in Figure 4A, H1-Fab disrupted the hPCSK9/LDL-R interaction.

77

3. Effect on HepG2 cells

LDL-uptake was measured using flow cytometry. HepG2 cells (ATCC) were maintained in DMEM with 10% (V/V) fetal bovine serum (FBS). Cells were seeded into a 96-well collagen-coated 96-well plate (BD Biosciences), the night before PCSK9 Ab treatment. 200 nM of PCSK9 protein was preincubated with anti-PCSK9 Fab at indicated concentrations for 30 minutes before adding to cells.

After PCSK9 and Fab treatment for 3 hours, dil-LDL (Intracel) was added directly into each well to a final concentration of 5 ug/ml and incubated for one additional hour at 37°C, 5% CO₂. Cells were trypsinized, harvested, and dil-LDL positive cells were measured by flow cytometry (LSRII, BD Biosciences). Geometric means were analyzed using FlowJo 5.7.2 software, normalized to buffer control, and reported in Figure 4.

Surface LDL was also measured using flow cytometry (Figure 4B). HepG2 cells were trypsinized, seeded in collagen coated plate and incubated overnight at 37°C with 5% CO₂ to allow the recovery of LDL-R expression. The following day, PCSK9 protein and PCSK9 Fab were premixed 30 minutes before incubating with cells for 4 hours. Cells were harvested with Versene (Invitrogen) and blocked with donkey serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories) prior to staining with a rabbit anti-Human LDL-R polyclonal antibody (Fitzgerald) and subsequently with APC-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories). After washing, cells were fixed with 2% paraformaldehyde and subjected to flow cytometry analysis on a BD LSR-II cytometer. The averages of geometric means were calculated using FlowJo 5.7.2 software and reported in Figure 4.

As shown in Figure, H1-Fab led to increased surface LDL-R levels (Figure 4B) and increased LDL-uptake by Hep2 cells (Figure 4C).

Example 6: Epitope Mapping

In this example, deuterium exchange mass spectrometry (DXMS) was used to determine the epitope(s) recognized by H1-Fab as follows.

A. Materials

Protein diluent (H₂O or D₂O) was 20 mM sodium phosphate, pH 7.3 with 150 mM NaCl. The quenching solution was 0.5% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in water. All other chemicals were purchased from Sigma, and HPLC grade solvents were from Fisher Scientific. Protein:Fab incubations were prepared and allowed to incubate for at least 2 h at 4° C.

B. Solution Hydrogen/Deuterium (H/D) Exchange

Automated H/D exchange mass spectrometry experiments were performed with a similar setup and similar fashion as described in the literature (Anal. Chem. 2006, 78, 1005-1014). In short, a LEAP Technologies Pal HTS liquid-handler (LEAP Technologies, Carrboro, NC) was used for all liquid handling operations. The liquid-handler was controlled by automation scripts written in LEAP Shell that were coded by the manufacturer. The robot was housed in a refrigerated enclosure maintained at 2° C. Plates for sample, diluent, and quench solution were loaded into the liquid-handler trays before the start of an experimental sequence. A 6-port injection valve and a wash station were also mounted on the liquid-handler rail and facilitate sample injection into the chromatographic system and syringe washing, respectively. The chromatographic system consisted of two additional valves, an enzyme column, a reversed-phase trap cartridge, and an analytical column was housed in a separate chamber constructed in house and maintained at 2° C by peltier stacks. The fluid connections and fitting of the immobilized pepsin, reversed-phase trap cartridge, and analytical column to the valves is illustrated in Figure 5. Valves and columns were configured in such a way as to allow in-line protein digestion, peptide desalting, and reversed-phase chromatography prior to introduction of the sample into the electrospray ionization (ESI) source of the mass spectrometer. The fluid streams required for operation were provided by two separate Agilent HPLC systems (Agilent 1100, Palo Alto, CA). The first HPLC pump (loading pump) delivered 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in water at 125 µL/min. The valve positions during the load phase are illustrated in Figure 5A. In this phase the sample is transferred from the sample loop through the immobilized pepsin cartridge (2mm x20mm, kindly provided by Prof. Virgil Woods of UCSD) onto a reversed-phase trap cartridge (1mm x 8mm, Michrom Bioresources Inc., Auburn, CA). Subsequently, auxiliary valve 2

was switched such that the second HPLC pump (gradient pump) delivered a gradient through the reversed phase trap cartridge and the analytical column into auxiliary valve 3. The immobilized enzyme cartridge was isolated to waste in this position. The auxiliary valve 3 was programmed to divert flow to waste for a preset time period for desalting (Figure 5B) of the sample loaded on the trap cartridge. After the desalting period the valve was switch so as to allow the flow from the gradient pump to reach the ion source of the mass spectrometer (after passing through the trap cartridge and the analytical column, Figure 5C). The gradient pump delivered a gradient of 0 to 40% mobile phase B over 55 minutes at 50 μ L/min (mobile phase A=0.2% formic acid in water, B=0.2% formic acid in acetonitrile).

C. Mass Spectrometry

Liquid Chromatography Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS) was performed on a QToF Ultima Global (Waters, Milford, MA) operated in V mode. Two data-dependent MS/MS switching experiments were performed to collect tandem mass spectra for the purpose of identifying the sequences of the peptides generated by on-line proteolysis. Acquisitions performed for the purpose of deuterium level determination were MS-only (5s scans over m/z 400-1500).

D. Complementary Hydrogen/Deuterium (H/D) Exchange Experiments

The protein (hPCSK9 and its prodomain PD) was subjected to several on-and off-exchange conditions with the expected net result being a marking of any potential epitope by an increase in deuterium levels with respect to the control in the protection experiment (described below) and a reduction in deuterium level with respect to the control in the In-D₂O experiment (described below).

Deuterium, which is the exchange of amide hydrogens on the protein with deuterium is an especially useful tool for the probing of structure and function of proteins because labeling with deuterium does not change structure or function of the labeled protein. Deuterium is an isotope of hydrogen that has twice the mass of hydrogen, indicated in Figure 6 by stars. This is in stark contrast to other methods of labeling that attach new moieties to existing functional groups on proteins.

1. Protection Experiment

In the protection experiment, deuterated protein solution was prepared by overnight incubation of the protein in 20 mM sodium phosphate, pH 7.3 with 150 mM NaCl in D₂O. In the control experiment deuterated protein was diluted with H₂O and after varying time periods of off-exchange (e.g. 5min) quench solution was added. This was followed by on-line digestion with pepsin and LCMS as described above. Off-exchange of the protein:Fab complex was performed by dilution of the deuterated protein solution with an equimolar amount of Fab solution (non-deuterated, see schematic Figure 6, right column) and incubation for 15min to form the protein(deuterated):Fab complex. After formation of the complex the sample was treated as described below for the control.

The left column of Figure 6 illustrates the experimental sequence for the protection experiment, which starts out with deuterated PCSK9. "Deuterated" means that the amide hydrogens of the protein have been replaced with deuterium by incubation of the protein in deuterium buffer for a period of several hours. As illustrated in the second row in the left column of Figure 6, the binding of the Fab to its epitope on deuterated PCSK9 protein will block part of the surface of PCSK9 around the area of the epitope. The blocking of the surface also reduces solvent access, which is critical for hydrogen/deuterium exchange to occur. In the third row in the left column of Figure 6 the effect of incubation of deuterated PCSK9/Fab complex in non-deuterated buffer is illustrated.

As shown in Figure 6, deuteration levels on PCSK9 are rapidly reduced on the solvent accessible areas because H/D exchange can occur freely. In contrast, the reduced solvent access to the area of the epitope due to the blocking action of the Fab that covers the surface causes H/D exchange to be slowed. This results in the preservation of most of the deuteration in the area of the epitope.

It is possible to locate the increased levels of deuteration (marking the epitope) along the protein sequence by cutting of the protein Fab complex into smaller pieces with an enzyme and measuring the deuteration level of each of the fragments with a mass spectrometer. This is possible because of the mass change that results from deuteration as deuterium is heavier than hydrogen. Stitching together the information collected from the fragments allows one to derive the distribution of deuterium across the protein sequence.

71

2. Control

Because deuteration levels vary greatly across the protein sequence due to protein structure and the resulting variation in solvent accessibility as well as the differences in H/D exchange rates observed for amide bonds formed between different amino acids it is impossible to conclude solely from an elevated deuteration level observed in the protection experiment (described by the left column of Figure 6) on the presence of an epitope. Fortunately, the natural variation of deuteration levels cancels out in a differential experiment. The differential experiment consists of the measurement of deuteration levels in the presence and absence (control experiment, center column of Figure 6) of the Fab and calculation of the difference in deuteration. The observed differences in deuteration level are attributable purely to the effects of the Fab and large values will be indicative of the presence and location of epitopes.

3. In-D₂O Experiment

Further, a complementary differential experiment (*i.e.*, an in-D₂O experiment) illustrated in the right column of Figure 6 can be performed and the expected result deduced using similar reasoning as that put forward for the left column experiment. The major difference being that the observed difference in deuteration for the right column experiment should be opposite in sign to that of the left column and provide therefore complementary evidence for the presence and location of a potential epitope as well as validation of results against each other.

In a typical In-D₂O experiment (see schematic Figure 6, middle and right column) protein (control) or alternatively protein:Fab complex is diluted into D₂O buffer. After a fixed period of on-exchange the mixture is further diluted with H₂O buffer to cause off-exchange and finally quenched with quench buffer. Once mixed, the quenched solution is fully automatically proteolyzed, separated and analyzed by LCMS as described above. Various D₂O incubation periods (e.g. 45s) were used in the experiment to optimize the observed differences in deuteration between control (protein only) and the protein:Fab sample. The average change in deuteration between sample and control was calculated as the difference between the deuterium uptake levels of the sample and control, where deuterium uptake levels were determined as described below under data processing.

72

E. Data Processing

Tandem MS acquisitions were reduced to peak lists using MassLynx (Waters, Milford, MA) and searched against the protein sequence using Mascot (Matrix Sciences, London, UK). A list of probable peptide sequence identifications returned by the database search were manually validated. MassLynx was used to generate single ion chromatograms of the validated precursor ion masses. Mass spectra of the isotopic distributions of each precursor were summed across the chromatographic peak, smoothed and centered so as to determine the level of deuterium uptake. To assign a deuterium uptake level to each residue of the protein sequence the following procedure was followed. Residues were assigned the normalized deuterium uptake of the peptides that covered them. If more than one peptide covered the same residue the average of the normalized deuterium uptake of all the peptides covering that residue was used. The normalized deuterium uptake for each peptide was calculated by dividing the observed deuteration level by the number of amino acids in that peptide.

F. Results

The observed average change in deuteration for the protection and the In-D₂O experiment carried out on hPCSK9 and hPCSK9:H1-Fab complex as a function of residue number of hPCSK9 (prodomain included, cystine rich domain is excluded as it was not covered by the experiments) is shown in Figure 7. The amino acid sequences of the regions showing the expected behavior of a potential epitope are also shown in Figure 7.

Figure 7A shows the change in deuteration for the protection experiment. The change in deuteration is defined as the difference between the deuteration level of the experiment illustrated in Figure 6 (left column, with Fab present) and its control (middle column, no Fab). The change in deuteration is plotted as the average mass shift per residue over the residue number for amino acid residues 40 to 420 of the PCSK9 sequence (starting with the pro-domain and excluding the cysteine rich domain). A high value for the change in deuteration (indicated as a positive mass shift per residue) is indicative of an epitope. The region of residues 123-132

(sequence annotated in plots) stands out in this regard and is therefore considered to cover all or part of an epitope.

The complementary data from the In-D₂O experiment (illustrated in the right column in Figure 6) is plotted in Figure 7A. Comparison of the two plots depicted in Figure 7 reveals that the stretch of amino acid residues 123-132 LVKMSGDLLE shows the anticipated change of deuteration levels for an epitope as expected from the experimental design (Figure 6). The region 123-132 (LVKMSGDLLE) in the hPCSK9 crystal structure (see Figure 8) covers part of a helix and loop and makes physical sense as a potential epitope as it is highly accessible.

Not immediately obvious from the data shown in Figure 7 is a second region spanning residues 101-107 (QAARRGY) (see Figure 8), which is a subsection of a larger region that also shows the expected complementary behavior in deuteration levels in Figure 7 that would be characteristic of a potential epitope. It turns out that the method used for mapping back the change in deuteration level from the deuteration of the observed peptides onto the primary sequence has a strongly smoothing effect, which is desirable as the fluctuations observed in the measurement are quite large.

On the other side, this delocalization of deuterium levels makes it harder to detect the likely participation of the region covered by residue 101-107 in the epitope from the data as it is plotted in Figure 7. Yet, detailed inspection of the peptides observed to cover the larger region allows most of the observed exchange to be attributed to the much shorter region 101-107.

Further, it is important to note in the crystal structure that this shorter region is spatially located right next to region 123-132, which suggests that both stretches form the non-linear epitope of H1-Fab on hPCSK9. Importantly, the 2 amino acid stretches implicated by the data of Figure 7 form a non-linear epitope for H1-Fab, which correlates with the predicted SEQ ID NO 2 and 3 amino acid sequences for antigenic epitopes of hPCSK9 (Table 2).

74

WHAT IS CLAIMED IS:1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

1. An isolated Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 polypeptide (PCSK9) binding molecule comprising an antigen binding portion of an antibody that specifically binds to a PCSK9, wherein the antigen binding portion binds to an epitope within the catalytic domain of human PCSK9 (SEQ ID NO:1) within or overlapping one of the following:

- (a) amino acids 166-177 of SEQ ID NO:1;
- (b) amino acids 187-202 of SEQ ID NO:1;
- (c) amino acids 206-219 of SEQ ID NO:1;
- (d) amino acids 231-246 of SEQ ID NO:1;
- (e) amino acids 277-283 of SEQ ID NO:1;
- (f) amino acids 336-349 of SEQ ID NO:1;
- (g) amino acids 368-383 of SEQ ID NO:1; or
- (h) amino acids 426-439 of SEQ ID NO:1.

2. An isolated PCSK9 binding molecule comprising an antigen binding portion of an antibody that specifically binds to a PCSK9, wherein the antigen binding portion binds to an epitope within the cysteine-rich domain of human PCSK9 within or overlapping one of the following:

- (a) amino acids 443-500 of SEQ ID NO: 1;
- (b) amino acids 557-590 of SEQ ID NO: 1; or
- (c) amino acids 636-678 of SEQ ID NO: 1.

3. An isolated PCSK9 binding molecule comprising an antigen binding portion of an antibody that specifically binds to a PCSK9, wherein the antigen binding portion binds to an epitope within the pro-domain of human PCSK9 within or overlapping amino acids 89-134 of SEQ ID NO:1.

4. The PCSK9 binding molecule of any of claims 1-3, wherein the antigen binding portion is cross reactive with a PCSK9 of a non-human primate.

- 32 5. The PCSK9 binding molecule of any of claims 1-3, wherein the antigen
33 binding portion is cross reactive with a PCSK9 of a rodent species.
34
- 35 6. The PCSK9 binding molecule of any of claims 1-3, wherein the antigen
36 binding portion binds to a linear epitope.
37
- 38 7. The PCSK9 binding molecule of any of claims 1-3, wherein the antigen
39 binding portion binds to a non-linear epitope.
40
- 41 8. The PCSK9 binding molecule of claim 7, wherein the antigen binding
42 portion binds to a non-linear epitope consisting of at least one portion of each of the
43 following linear epitopes:
44 (a) amino acids 89-101 of SEQ ID NO:1; and
45 (b) amino acids 106-134 of SEQ ID NO:1.
46
- 47 9. The PCSK9 binding molecule of claim 7, wherein the antigen binding
48 portion binds to a non-linear epitope consisting of at least one portion of each of the
49 following linear epitopes:
50 (a) amino acids 166-177 of SEQ ID NO:1; and
51 (b) amino acids 443-458 of SEQ ID NO:1.
52
- 53 10. The PCSK9 binding molecule of claim 7, wherein the antigen binding
54 portion binds to a non-linear epitope consisting of at least one portion of two or three
55 of the following linear epitopes:
56 (a) amino acids 187-202 of SEQ ID NO:1;
57 (b) amino acids 231-246 of SEQ ID NO:1; and
58 (c) amino acids 368-383 of SEQ ID NO:1.
59
- 60 11. The PCSK9 binding molecule of claim 7, wherein the antigen binding
61 portion binds to a non-linear epitope consisting of at least one portion of each of the
62 following linear epitopes:
63 (a) amino acids 206-219 of SEQ ID NO:1; and
64 (b) amino acids 277-283 of SEQ ID NO:1.

76

65

66 12. The PCSK9 binding molecule of claim 7, wherein the antigen binding
67 portion binds to a non-linear epitope consisting of at least one portion of each of the
68 following linear epitopes:

69 (a) amino acids 336-349 of SEQ ID NO:1; and

70 (b) amino acids 426-439 of SEQ ID NO:1.

71

72 13. The PCSK9 binding molecule of claim 7, wherein the antigen binding
73 portion binds to a non-linear epitope consisting of at least one portion of two or three
74 of the following linear epitopes:

75 (a) amino acids 459-476 of SEQ ID NO:1;

76 (b) amino acids 486-500 of SEQ ID NO:1; and

77 (c) amino acids 557-573 of SEQ ID NO:1.

78

79 14. The PCSK9 binding molecule of claim 7, wherein the antigen binding
80 portion binds to a non-linear epitope consisting of at least one portion of two or three
81 of the following linear epitopes:

82 (a) amino acids 577-590 of SEQ ID NO:1;

83 (b) amino acids 636-645 of SEQ ID NO:1; and

84 (c) amino acids 659-677 of SEQ ID NO:1.

85

86 15. The PCSK9 binding molecule of claim 2, wherein the antigen binding
87 portion specifically binds to an epitope of human PCSK9 within or overlapping within
88 or overlapping one of the following:

89 (a) amino acids 443-458 of SEQ ID NO:1;

90 (b) amino acids 459-476 of SEQ ID NO:1;

91 (c) amino acids 486-500 of SEQ ID NO:1;

92 (d) amino acids 557-573 of SEQ ID NO:1;

93 (e) amino acids 577-590 of SEQ ID NO:1;

94 (f) amino acids 636-645 of SEQ ID NO:1; or

95 (g) amino acids 659-677 of SEQ ID NO:1 .

96

27

97 16. The PCSK9 binding molecule of claim 3, wherein the antigen binding
98 portion specifically binds to an epitope of human PCSK9 within or overlapping one of
99 the following:

100 (a) amino acids 89-101 of SEQ ID NO:1; or

101 (b) amino acids 106-134 of SEQ ID NO:1.

102

103 17. The PCSK9 binding molecule of any preceding claim, wherein the antigen
104 binding portion binds to PCSK9 with a dissociation constant (K_D) equal to or less than
105 10 nM.

106

107 18. The PCSK9 binding molecule of any preceding claim, wherein the antigen
108 binding portion binds to PCSK9 with a dissociation constant (K_D) equal to or less than
109 1 nM.

110

111 19. The PCSK9 binding molecule of claim 18, wherein the antigen binding
112 portion binds to PCSK9 with a K_D equal to or less than 0.5 nM.

113

114 20. The PCSK9 binding molecule of claim 19, wherein the antigen binding
115 portion binds to a human PCSK9 with a K_D equal to or less than 0.1 nM.

116

117 21. The PCSK9 binding molecule of claim 18, wherein the antigen binding
118 portion binds to PCSK9 of a non-human primate with a K_D equal to or less than 0.3
119 nM.

120

121 22. The PCSK9 binding molecule of claim 18, wherein the antigen binding
122 portion thereof binds to mouse PCSK9 with a K_D equal to or less than 0.5 nM.

123

124 23. The PCSK9 binding molecule of any preceding claim, wherein the antigen
125 binding portion is an antigen binding portion of a human antibody.

126

127 24. The PCSK9 binding molecule of claim 23, wherein the antibody is a
128 humanized or humanized antibody.

129

130 25. The PCSK9 binding molecule of any preceding claim, wherein the antigen
131 binding portion is an antigen binding portion of a monoclonal antibody.

132

133 26. The PCSK9 binding molecule of claim 23, wherein the antigen binding
134 portion is an antigen binding portion of a polyclonal antibody.

135

136 27. The PCSK9 binding molecule of any of claims 1-26, wherein the PCSK9
137 binding molecule is a chimeric antibody.

138

139 28. The PCSK9 binding molecule any of claims 1-26, wherein the PCSK9
140 binding molecule comprises an Fab fragment, an Fab' fragment, an F(ab')₂, or an Fv
141 fragment of the antibody.

142

143 29. The PCSK9 binding molecule of any of claims 1-26, wherein the PCSK9
144 binding molecule comprises a single chain Fv.

145

146 30. The PCSK9 binding molecule of any of claims 1-26, wherein the PCSK9
147 binding molecule comprises a diabody.

148

149 31. The PCSK9 binding molecule of any preceding claim, wherein the antigen
150 binding portion is derived from an antibody of one of the following isotypes: IgG1,
151 IgG2, IgG3 or IgG4.

152

153 32. The PCSK9 binding molecule of any preceding claim, wherein the
154 PCSK9 binding molecule inhibits PCSK9 binding to a PCSK9 ligand.

155

156 33. The PCSK9 binding molecule of any preceding claim, wherein the
157 PCSK9 binding molecule inhibits PCSK9 binding to a low density lipoprotein
158 receptor (LDL-R).

159

160 34. The PCSK9 binding molecule of any preceding claim, wherein the
161 PCSK9 binding molecule inhibits proteolytic activity of PCSK9.

162

29

163 35. The PCSK9 binding molecule of claim 34, wherein the PCSK9 binding
164 molecule inhibits proteolysis of the PCSK9 pro-domain.

165
166 36. The PCSK9 binding molecule of any preceding claim, wherein the
167 PCSK9 binding molecule inhibits a PCSK9-dependent decrease of LDL-R on a
168 hepatocyte.

169
170 37. The PCSK9 binding molecule of claim 36, wherein the PCSK9 binding
171 molecule inhibits PCSK9 dependent degradation of LDL-R on hepatocytes.

172
173 38. The PCSK9 binding molecule of any preceding claim, wherein the
174 PCSK9 binding molecule, when contacted with a hepatocyte under conditions in
175 which PCSK9 is present, increases low density lipoprotein cholesterol (LDL-c)
176 uptake by the hepatocyte, relative to LDL-c uptake by a hepatocyte in the absence of
177 the PCSK9 binding molecule.

178
179 39. The PCSK9 binding molecule of any preceding claim, wherein the
180 PCSK9 binding molecule binds to PCSK9 in the presence of LDL-C.

181
182 40. The PCSK9 binding molecule of any preceding claim, wherein the
183 PCSK9 binding molecule binds to PCSK9 in the presence of serum.

184
185 41. A PCSK9 binding molecule comprising a PCSK9 binding domain,
186 wherein the amino acid sequence of the PCSK9 binding domain is at least 75%
187 identical to an amino acid sequence of an immunoglobulin-like fold of a fibronectin, a
188 cytokine receptor, or a cadherin, and wherein the amino acid sequence of the PCSK9
189 binding domain is altered, relative to the amino acid sequence of the immunoglobulin-
190 like fold, such that the PCSK9 binding domain specifically binds to the PCSK9.

191
192 42. The PCSK9 binding molecule of claim 41, wherein the PCSK9 binding
193 domain binds to the PCSK9 with a K_D equal to or less than 10 nM.

194

90

- 195 43. The PCSK9 binding molecule of claim 41, wherein the PCSK9 binding
196 domain binds to the PCSK9 with a K_D equal to or less than 1 nM.
197
- 198 44. The PCSK9 binding molecule of claim 41, wherein the Ig-like fold is an
199 Ig-like fold of a fibronectin.
200
- 201 45. The PCSK9 binding molecule of claim 44, wherein the Ig-like fold is an
202 Ig-like fold of fibronectin type III .
203
- 204 46. A pharmaceutical composition comprising the PCSK9 binding molecule
205 any of claims 1-45.
206
- 207 47. A method of increasing LDL-R levels on a hepatocyte, the method
208 comprising contacting the hepatocyte with a PCSK9 binding molecule.
209
- 210 48. A method of increasing LDL-c uptake by a hepatocyte, the method
211 comprising contacting the hepatocyte with a PCSK9 binding molecule, thereby
212 reducing downregulation of LDL-R by PCSK9 and increasing LDL-c uptake by the
213 hepatocyte.
214
- 215 49. A peptide consisting of an amino acid sequence at least 90% identical to
216 one of following amino acid sequences:
217 YRADEYQPPDGG (SEQ ID NO:4);
218 TSIQSDHREIEGRVMV (SEQ ID NO:5);
219 ENVPEEDGTRFHRQ (SEQ ID NO:6);
220 AGVVSGRDAGVAKGAS (SEQ ID NO:7);
221 VQPVGPL (SEQ ID NO:8);
222 VGATNAQDQPVTLG (SEQ ID NO:9);
223 IIGASSDCSTCFVSQS (SEQ ID NO:10);
224 EAWFPEDQRVLTPN (SEQ ID NO:11);
225 ALPPSTHGAGWQLFCR (SEQ ID NO:12);
226 TVWSAHSGPTRMATAIAR (SEQ ID NO:13);
227 CSSFSRSGKRRGERM (SEQ ID NO:14);

228 HVLTCSSHWEVEDLGT (SEQ ID NO:15);
 229 PVLPRGQPNQCVG (SEQ ID NO:16);
 230 SALPGTSHVL (SEQ ID NO:17);
 231 RDVSTTGSTSEEAVTAVAI (SEQ ID NO:18);
 232 SQSERTARRLQAQ (SEQ ID NO:2); or
 233 GYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELA (SEQ ID NO:3).

234
 235 50. A method of modulating PCSK9 activity in a subject, the method
 236 comprising administering to the subject a PCSK9 binding molecule that modulates a
 237 biological activity of the PCSK9, wherein the PCSK9 binding molecule exhibits one
 238 or more of the following activities:

- 239 (a) inhibiting PCSK9 binding to a LDL-R,
- 240 (b) inhibiting proteolytic activity of the PCSK9,
- 241 (c) inhibiting PCSK9 dependent decrease of LDL-R on a hepatocyte,
- 242 and
- 243 (d) inhibiting PCSK9 dependent degradation of LDL-R in hepatocyte
- 244 cells.

245
 246 51. A method of reducing a plasma cholesterol a subject, the method
 247 comprising administering to the subject the composition of claim 46 in an amount
 248 effective to reduce plasma cholesterol in the subject.

249
 250 52. The method of claim 51, wherein the amount is effective to reduce LDL-
 251 c.

252
 253 53. The method of claim 52, wherein the subject's concentration of plasma
 254 LDL-c is reduced by at least 5%, relative to plasma LDL-c prior to administering the
 255 composition.

256
 257 54. The method of claim 51, wherein the subject is also receiving therapy
 258 with a second cholesterol-reducing agent.

259

92

260 55. The method of claim 54, wherein the second cholesterol reducing agent is
261 a statin.

262

263 56. The method of claim 51, wherein the subject has, or is at risk for, a lipid
264 disorder.

265

266 57. The method of claim 56, wherein the subject is hypercholesterolemic or is
267 at risk for hypercholesterolemia.

268

269 58. The method of claim 51, wherein the subject has, or is at risk for,
270 atherosclerosis.

271

272 59. The method of claim 51, wherein the subject has, or is at risk for, a
273 cardiovascular disorder.

274

275 60. The method of claim 51, wherein the subject is statin-intolerant.

276

277 61. The method of claim 51, wherein the subject is resistant to statin therapy.

278

279 62. The method of claim 51, wherein, prior to administration of the
280 composition, the subject's total plasma cholesterol level is 200 mg/dl or greater.

281

282 63. The method of claim 51, wherein prior to administration of the
283 composition, the subject's plasma LDL-c level is 160 mg/dl or greater.

284

285 64. The method of claim 51, wherein the composition is administered
286 intravenously.

287

288 65. An isolated PCSK9 binding molecule comprising an antigen binding
289 portion of an antibody that specifically binds to a PCSK9, wherein the antigen binding
290 portion binds to an epitope within the pro-domain of human PCSK9 within or
291 overlapping one of the following:

292 (a) amino acids 101-107 of SEQ ID NO: 1; or

93

293 (b) amino acids 123-132 of SEQ ID NO: 1.

294

295 66. The isolated PCSK9 binding molecule of claim 65, wherein the
296 antigen binding portion binds to an epitope within the pro-domain of human PCSK9
297 within or overlapping amino acids 101-107 of SEQ ID NO:1.

298

299 67. The isolated PCSK9 binding molecule of claim 65, wherein the
300 antigen binding portion binds to an epitope within the pro-domain of human PCSK9
301 within or overlapping amino acids 123-132 of SEQ ID NO:1.

302

303 68. An isolated PCSK9 binding molecule that cross-competes for binding
304 to PCSK9 with a PCSK9 binding molecule that binds to an epitope within the pro-
305 domain of human PCSK9 within or overlapping one of the following:

306 (a) amino acids 101-107 of SEQ ID NO: 1; or

307 (b) amino acids 123-132 of SEQ ID NO: 1.

308

309 69. The PCSK9 binding molecule of any of claims 65-67, wherein the antigen
310 binding portion binds to a non-linear epitope.

311

312 70. The PCSK9 binding molecule of claim 69, wherein the antigen binding
313 portion binds to a non-linear epitope comprising all or at least a portion of each of the
314 following linear epitopes:

315 (a) amino acids 101-107 of SEQ ID NO:1; and

316 (b) amino acids 123-132 of SEQ ID NO:1.

317

318 71. An isolated PCSK9 binding molecule comprising an antigen binding
319 portion of an antibody that specifically binds to a PCSK9, wherein the antigen binding
320 portion binds within amino acids 101-132 of SEQ ID NO:1.

321

322 72. The isolated PCSK9 binding molecule of claim 71, wherein the antigen
323 binding portion binds within amino acids 101-132 of SEQ ID NO:1 and comprises at
324 least one amino acid from SEQ ID NO:2 and at least one amino acid from SEQ ID
325 NO:3.

326 73. An isolated PCSK9 binding molecule comprising an antigen binding
327 portion of an antibody that specifically binds to a PCSK9, wherein the antigen binding
328 portion binds to an epitope that overlays at least one amino acid from SEQ ID NO:2
329 and at least one amino acid from SEQ ID NO:3.

330

331 74. An isolated PCSK9 binding molecule comprising an antigen binding
332 portion of an antibody that specifically binds to a PCSK9, wherein the antigen binding
333 portion binds to an epitope selected from the group consisting of an epitope within
334 SEQ ID NO:2, an epitope within SEQ ID NO:3, or an epitope that overlaps at least
335 one amino acid from SEQ ID NO:2 and at least one amino acid from SEQ ID NO:3.

336

337 75. The isolated PCSK9 binding molecule of claim 73 or 74 where the
338 amino acid of SEQ ID NO:2 is glutamine.

339

340 76. The isolated PCSK9 binding molecule of claim 73 or 74 where the
341 antigen binding portion overlaps at least two amino acids from SEQ ID NO:3.

342

343 77. The isolated PCSK9 binding molecule of claim 76 where the amino
344 acids are glycine and tyrosine.

345

346 78. The PCSK9 binding molecule of any of claims 65-67 and 69-77,
347 wherein the antibody is a human, humanized, humanized, or chimeric antibody.

348

349 79. The PCSK9 binding molecule of any of claims 65-67 and 69-77,
350 wherein the antigen binding portion is an antigen binding portion of a monoclonal or
351 polyclonal antibody.

352

353 80. The PCSK9 binding molecule of any of claims 65-77, wherein the PCSK9
354 binding molecule comprises an Fab fragment, a single chain Fv, an Fab' fragment, an
355 F(ab')₂, a diabody, or an Fv fragment of the antibody.

356

357 81. The PCSK9 binding molecule of any of claims 65-67 and 69-77, wherein
358 the antigen binding portion is derived from an antibody of one of the following
359 isotypes: IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4.

360

361 82. Use of a PSCK9 binding molecule of any of the preceding claims to
362 prepare a medicament for the treatment of disease associated with high cholesterol
363 levels.

96

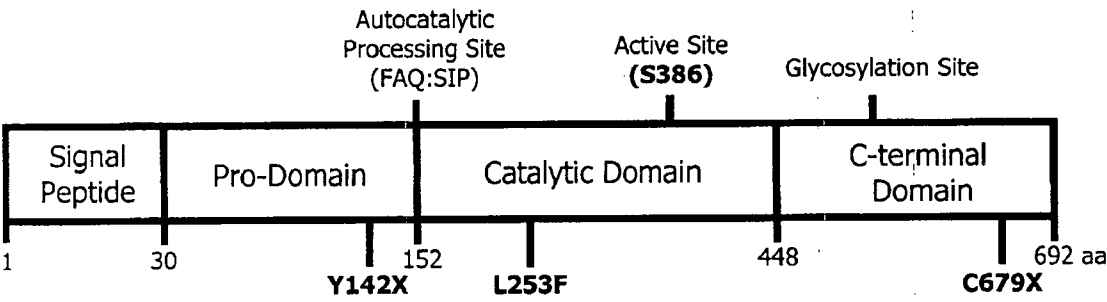


Fig. 1

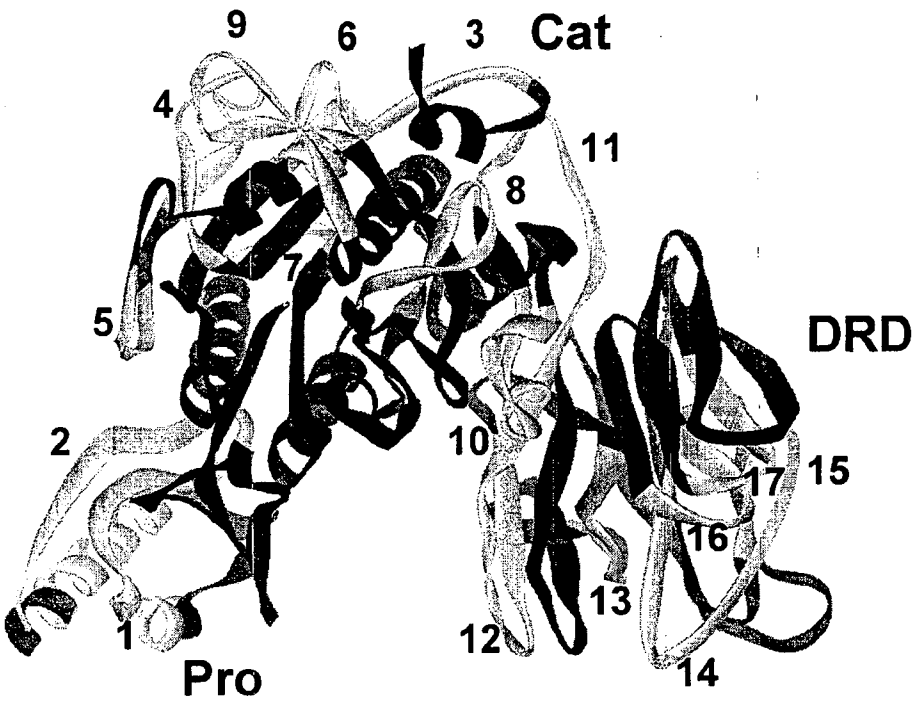


Fig. 2

97

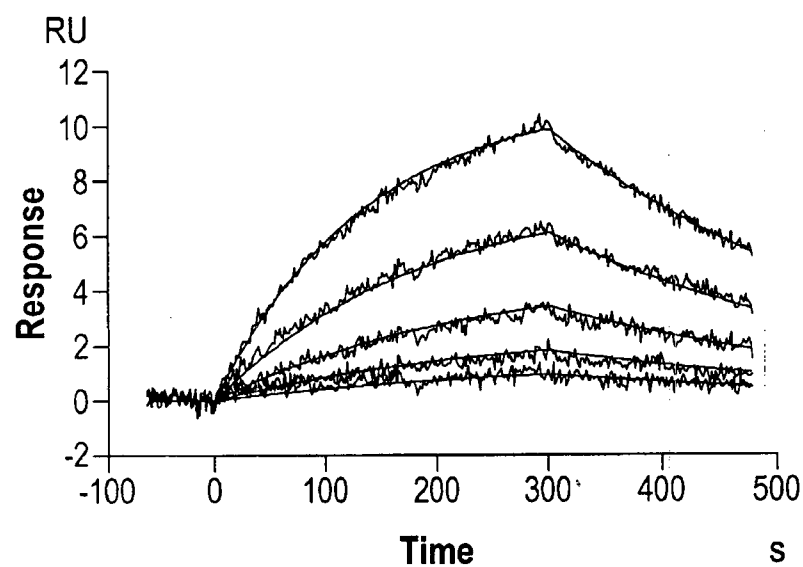


Fig. 3

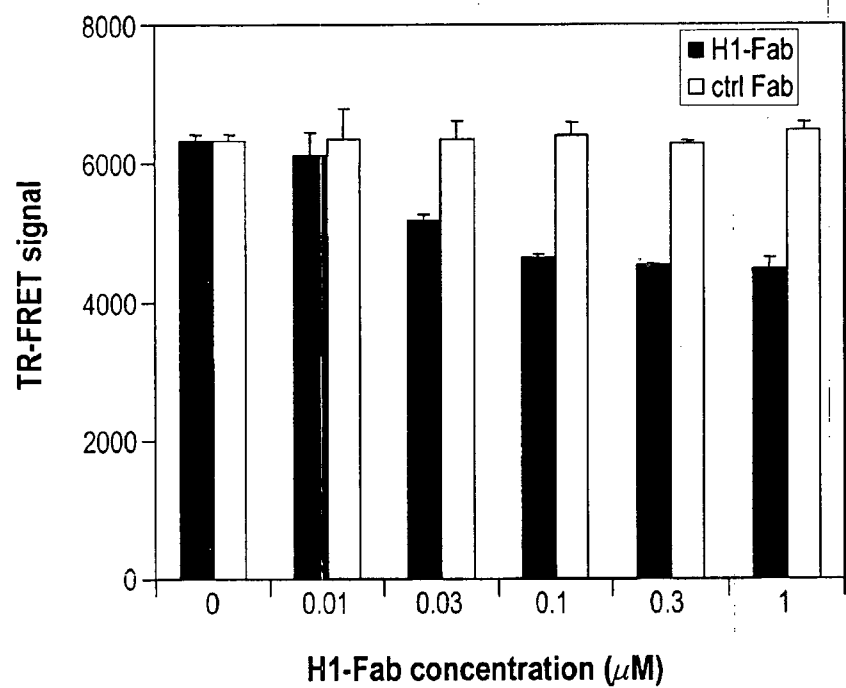


Fig. 4A

93

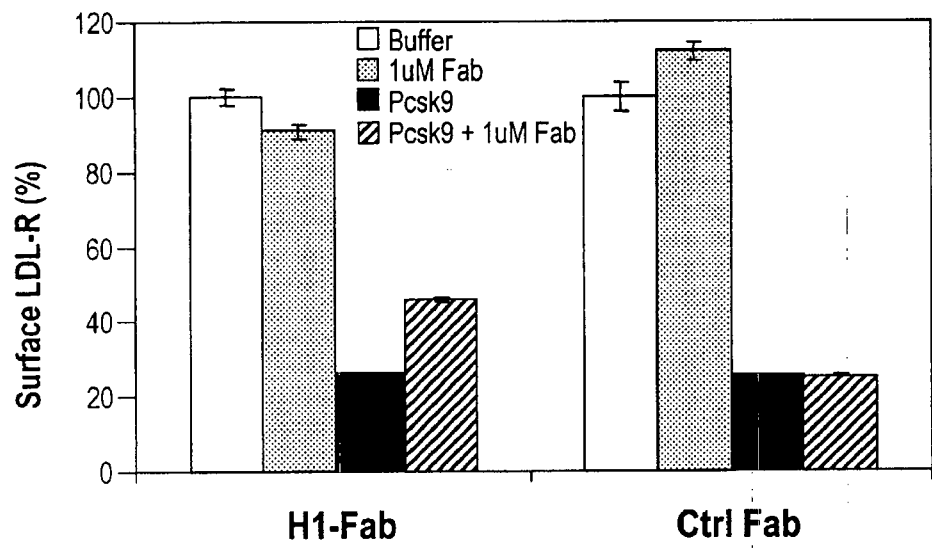


Fig. 4B

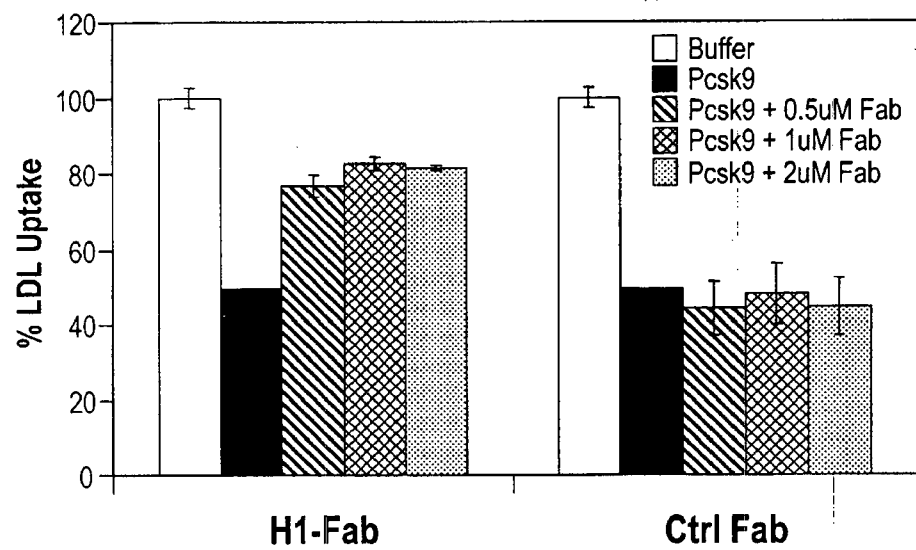


Fig. 4C

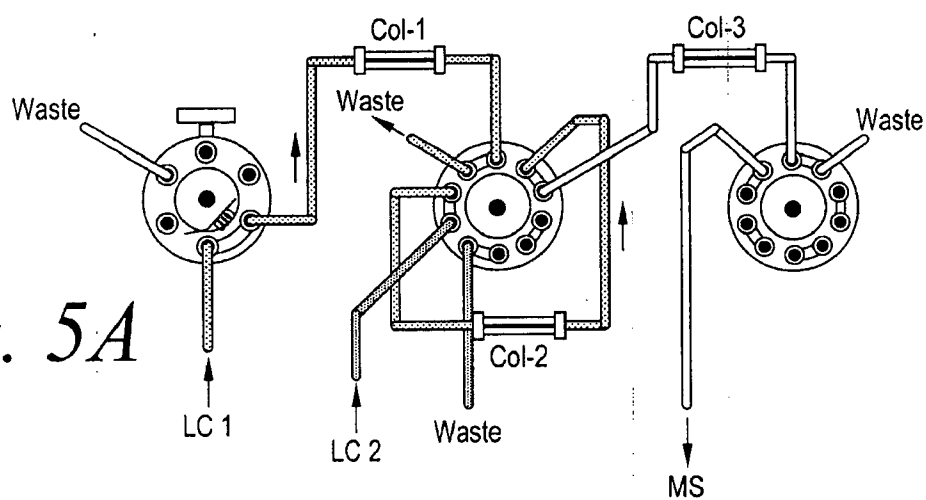


Fig. 5A

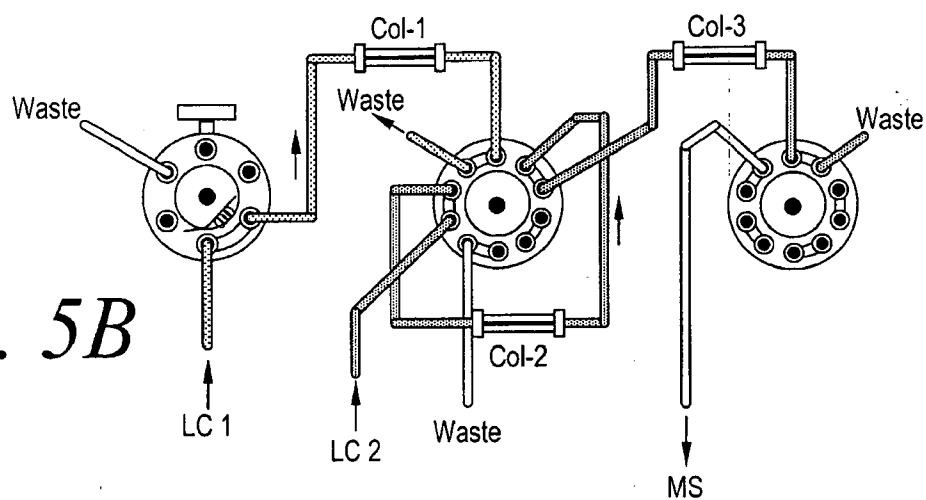


Fig. 5B

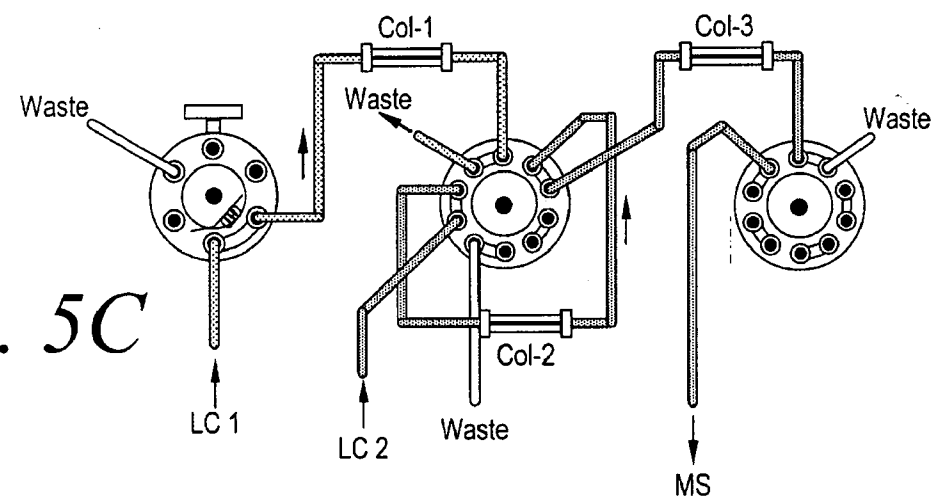
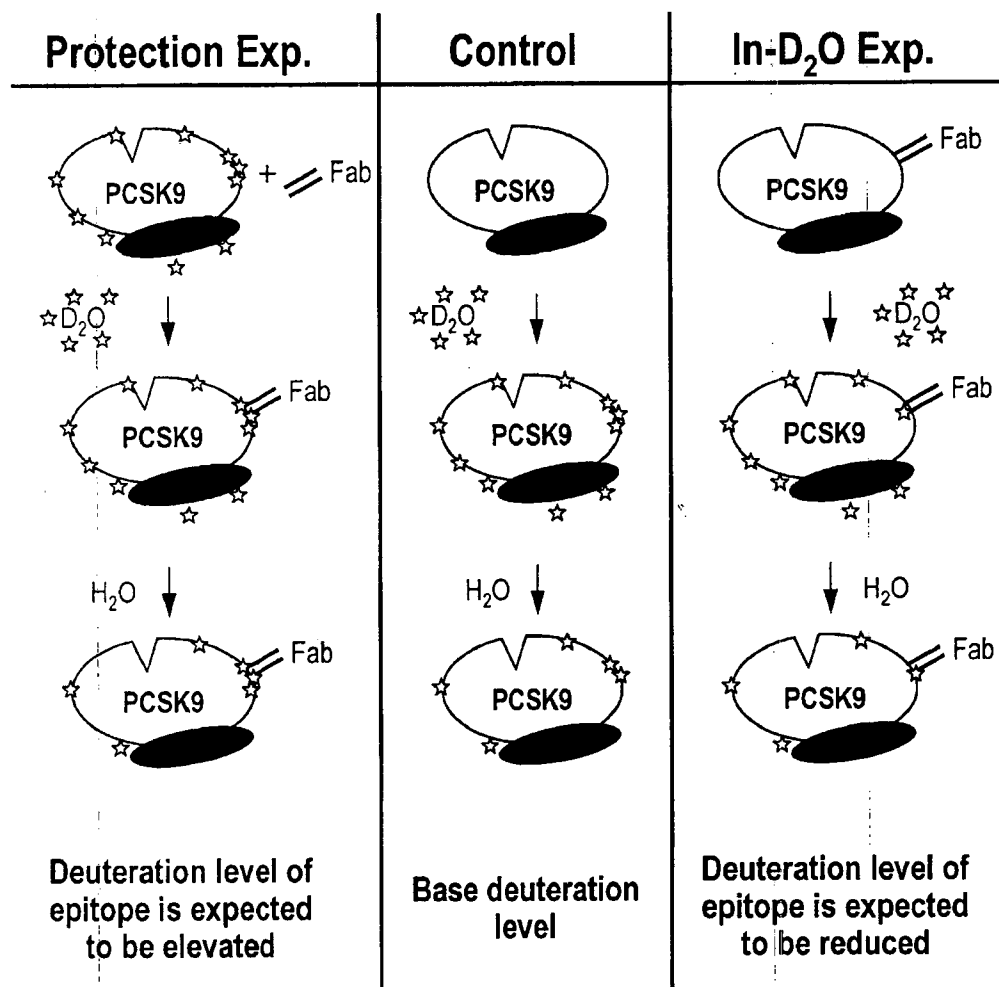


Fig. 5C



Schematic of the complementary H/D exchange experiments performed and the expected outcome.

Fig. 6

el

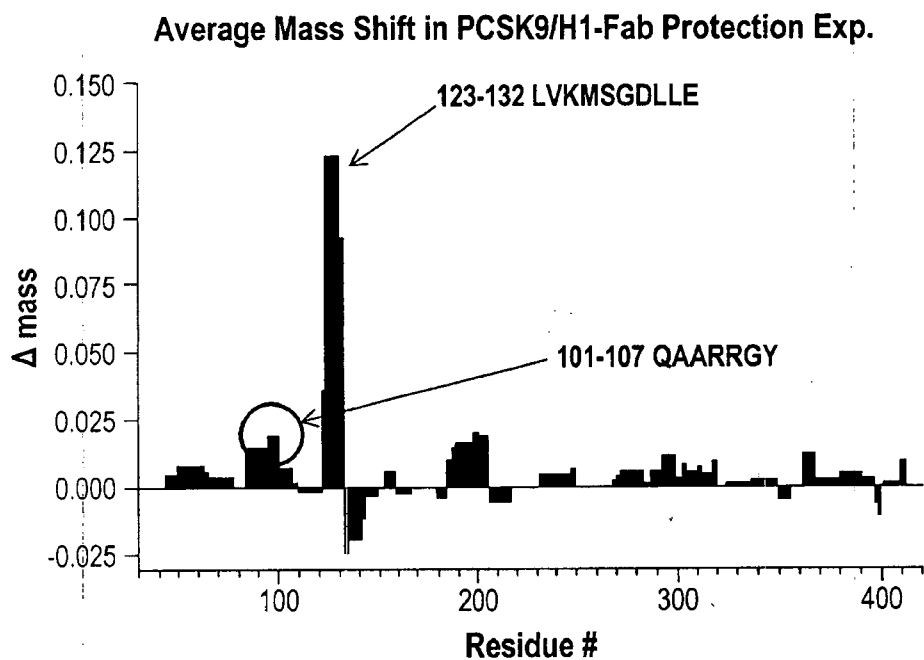


Fig. 7A

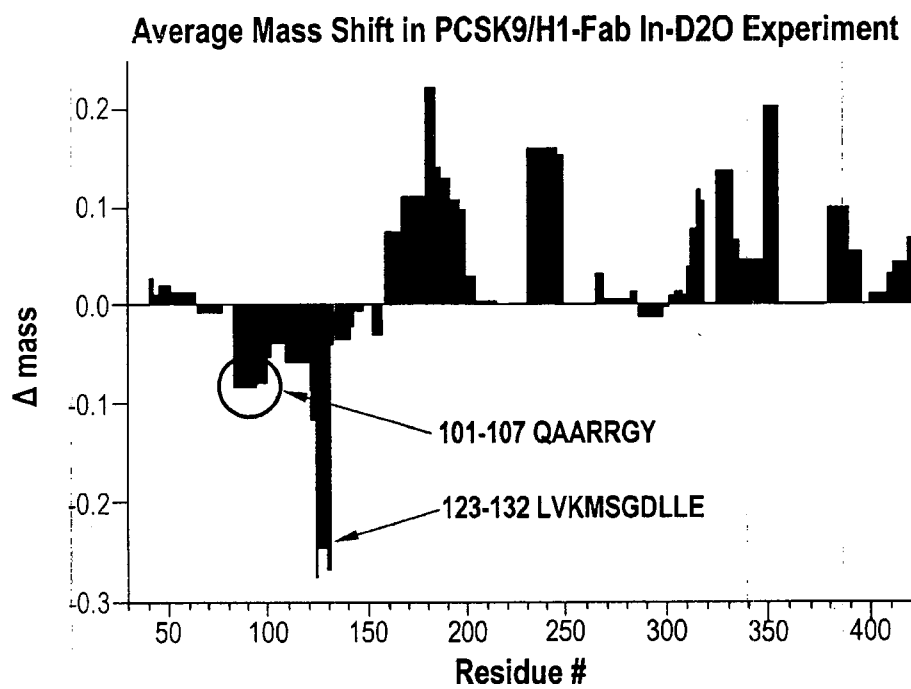


Fig. 7B

pr

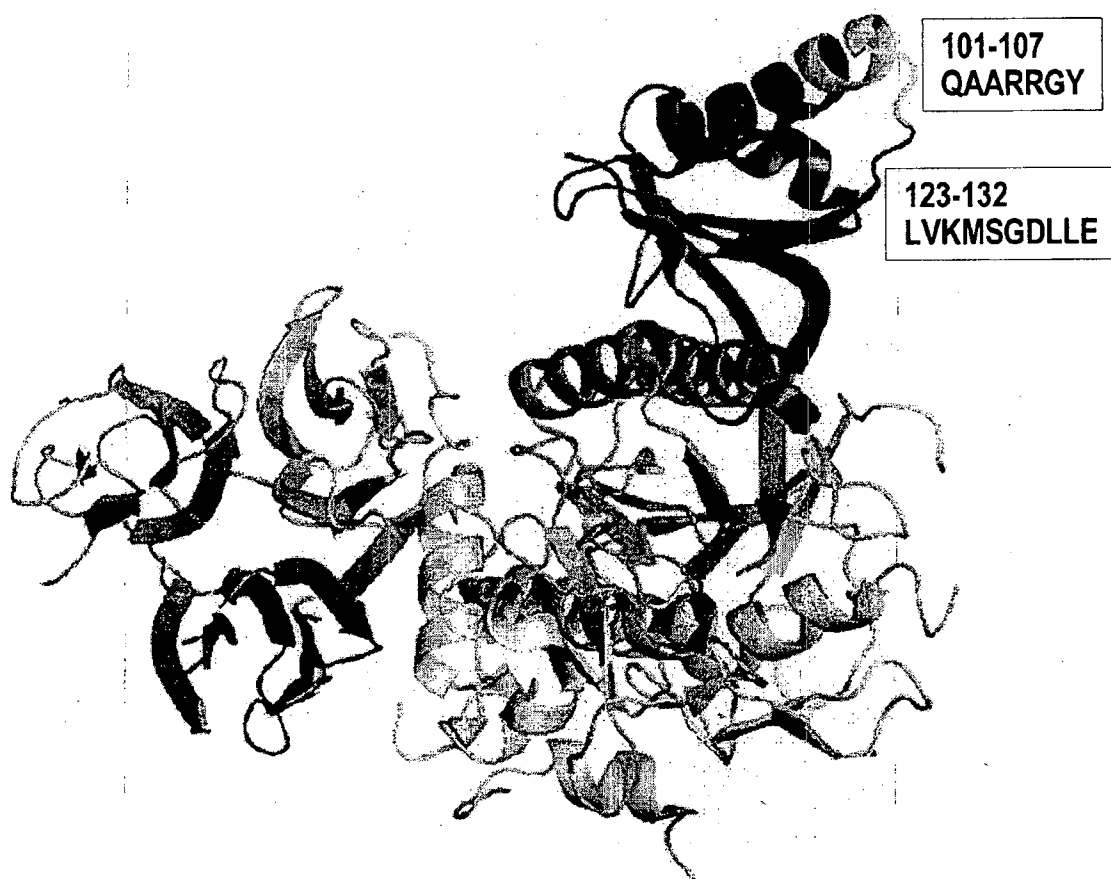


Fig. 8

107

MOLÉCULAS Y MÉTODOS PARA MODULAR LA PRO-PROTEÍNA
CONVERTASA-SUBTILISINA/QUEXINA TIPO 9 (PCSK9)

CAMPO TÉCNICO

5 Esta invención se refiere a moléculas de enlace de antígeno, a epítomos enlazados por estas moléculas, y a métodos para utilizar las moléculas.

ANTECEDENTES

La pro-proteína convertasa-subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9)
10 (también conocida como convertasa regulada por apoptosis neutra 1, o NARC-1) es un miembro de la sub-familia de tipo subtilisina secretora de proteinasa K de las proteasas de serina (Naureckiene y colaboradores, 2003 *Arc. Biochem. Biophys.* 420:55-67). La PCSK9 humana es una proteína secretada expresada primordialmente en los
15 riñones, en el hígado, y en los intestinos. Tiene tres dominios: un pro-dominio inhibidor (aminoácidos 1-152; que incluye una secuencia de señal en los aminoácidos 1-30), un dominio de proteasa de serina (aminoácidos 153-448), y un dominio C-terminal de 210 residuos de longitud (aminoácidos 449-692), el cual es rico en residuos de
20 cisteína. La PCSK9 se sintetiza como un cimógeno que sufre disociación auto-catalítica entre el pro-dominio y el dominio catalítico en el retículo endoplásmico. El pro-dominio permanece enlazado a la proteína madura después de la disociación, y se secreta el complejo. El dominio rico en cisteína puede tener un papel análogo al de los
25 dominios P-(procesamiento) de otras proteasas de serina de tipo

furina/quexina/subtilisina, que parecen ser esenciales para el pliegue y la regulación de la proteasa activada. Las mutaciones en la PCSK9 están asociadas con niveles anormales de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-c) en el plasma sanguíneo (Horton y colaboradores, 2006 *Trends. Biochem. Sci.* 32(2):71-77).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a epítopos de PCSK9, a moléculas de enlace de PCSK9, y a métodos para utilizar las moléculas. Las moléculas de enlace de PCSK9 interactúan con la PCSK9 y modulan las funciones de la PCSK9. Las moléculas de enlace de PCSK9 se pueden utilizar para aumentar los niveles de receptores de LDL (LDL-R) y para reducir los niveles de colesterol.

En diferentes aspectos, la invención proporciona moléculas de enlace de PCSK9 que modulan (por ejemplo, inhiben) una o más funciones biológicas de PCSK9. Por ejemplo, una molécula de enlace de PCSK9 puede inhibir la actividad proteolítica de PCSK9 (por ejemplo, la proteólisis del pro-dominio de PCSK9), y/o una interacción entre PCSK9 y un receptor de PCSK9 (por ejemplo, el enlace de PCSK9 con LDL-R). La PCSK9 disminuye el LDL-R de una manera posterior a la transcripción. Por consiguiente, la inhibición de PCSK9 da como resultado mayores niveles de LDL-R. Los mayores niveles de LDL-R *in vivo* permite que aumente la absorción de LDL-c mediada por LDL-R. Por lo tanto, las moléculas de enlace que interfieren con la regulación de LDL-R mediante PCSK9, finalmente reducen los niveles de LDL-c circulante.

Las moléculas de enlace de PCSK9 incluyen, por ejemplo, los anticuerpos que se enlazan con PCSK9 (por ejemplo, dentro de un dominio o epítipo particular de PCSK9, tal como el dominio catalítico o el dominio rico en cisteína), y los polipéptidos que incluyen porciones de enlace de antígeno de estos anticuerpos. Las moléculas de enlace de PCSK9 también incluyen moléculas en donde la porción de enlace no se deriva a partir de un anticuerpo, por ejemplo, las moléculas de enlace de PCSK9 derivadas a partir de polipéptidos que tienen un pliegue de tipo inmunoglobulina, y en donde se diseña la porción de enlace de antígeno para enlazarse con PCSK9 a través de clasificación aleatoria, selección, y maduración por afinidad.

De conformidad con lo anterior, en un aspecto, la invención proporciona una molécula de enlace de PCSK9 que incluye una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo que se enlaza (por ejemplo, se enlaza específicamente) con una PCSK9, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro del dominio catalítico de la PCSK9 humana (SEQ ID NO:1) dentro o traslapándose con (por ejemplo, comprendiendo o consistiendo en todos o una porción de) uno de los siguientes: (a) aminoácidos 166-177 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: YRADEYQPPDGG (SEQ ID NO:4)); (b) aminoácidos 187-202 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: TSIQSDHREIEGRVMV (SEQ ID NO:5)); (c) aminoácidos 206-219 de la SEQ ID NO:1 (es

decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: ENVPEEDGTRFHRQ (SEQ ID NO:6)); (d) aminoácidos 231-246 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: AGVVSGRDAGVAKGAS (SEQ ID NO:7));

5 (e) aminoácidos 277-283 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: VQPVGPL (SEQ ID NO:8)); (f) aminoácidos 336-349 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: VGATNAQDQPVTLG (SEQ ID NO:9)); (g) aminoácidos 368-383 de la

10 SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: IIGASSDCSTCFVSQS (SEQ ID NO:10)); o (h) aminoácidos 426-439 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: EAWFPEDQRVLTPN (SEQ ID NO:11)).

15 Por ejemplo, la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 166-171, 169-174, o 172-177 de la SEQ ID NO:1; la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 187-193, 191-196, 194-199, o 197-202 de la SEQ ID NO:1; la porción de enlace de antígeno se

20 enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 206-211, 209-214, 212-217, 215-219 de la SEQ ID NO:1; la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 231-237, 235-240, 238-243, 241-246 de la SEQ ID NO:1; la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los

25 aminoácidos 277-282, o 279-283 de la SEQ ID NO:1; la porción de

enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 336-341, 339-343, 341-346, o 344-349 de la SEQ ID NO:1; la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 368-374, 372-377, 375-380, o 378-383 de la SEQ ID NO:1; la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 426-431, 429-434, 432-437, o 435-439 de la SEQ ID NO:1).

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de enlace de PCSK9 aislada, la cual comprende una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo que se enlaza (por ejemplo, se enlaza específicamente) con una PCSK9, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro del dominio rico en cisteína de la PCSK9 humana dentro o traslapándose con uno de los siguientes: (a) aminoácidos 443-500 de la SEQ ID NO: 1; (b) aminoácidos 557-590; o (c) aminoácidos 636-678.

En diferentes modalidades, la porción de enlace de antígeno se enlaza específicamente con un epítipo de la PCSK9 humana dentro o traslapándose con uno de los siguientes: (a) aminoácidos 443-458 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: ALPPSTHGAGWQLFCR (SEQ ID NO:12)); (b) aminoácidos 459-476 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: TVWSAHSGPTRMATA IAR (SEQ ID NO:13)); (c) aminoácidos 486-500 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: CSSFSRSGKRRGERM (SEQ ID NO:14)); (d) aminoácidos

557-573 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: HVLTCSSHWEVEDLGT (SEQ ID NO:15)); (e) aminoácidos 577-590 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: PVLPRGQPNQCVG (SEQ ID NO:16)); (f) aminoácidos 636-645 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: SALPGTSHVL (SEQ ID NO:17)); (g) aminoácidos 659-677 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: RDVSTTGSTSEEAVTA VAI (SEQ ID NO:18)).

Por ejemplo, la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 443-449, 447-452, 450-455, 453-458 de la SEQ ID NO:1; la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 459-465, 463-468, 466-471, 469-474, o 472-476 de la SEQ ID NO:1; la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 486-491, 489-494, 492-497, o 495-500 de la SEQ ID NO:1; la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 557-563, 561-566, 564-569, 567-572, o 569-573 de la SEQ ID NO:1; la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 577-582, 580-585, 583-588, o 586-590 de la SEQ ID NO:1; la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 636-643, o 640-645 de la SEQ ID NO:1; la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 659-665, 663-668, 665-670,

668-673, o 671-677 de la SEQ ID NO:1.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de enlace de PCSK9 aislada, la cual incluye una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo que se enlaza (por ejemplo, se enlaza específicamente) con una PCSK9, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro del pro-dominio de la PCSK9 humana, dentro o traslapándose con los aminoácidos 89-134 de la SEQ ID NO:1.

En diferentes modalidades, la porción de enlace de antígeno se enlaza específicamente con un epítipo de la PCSK9 humana dentro o traslapándose con uno de los siguientes: (a) aminoácidos 89-101 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: SQSERTARRLQAQ (SEQ ID NO:2)); o (b) aminoácidos 106-134 de la SEQ ID NO:1 (es decir, un epítipo dentro o traslapándose con la siguiente secuencia: GYLTKILHVFHGLL PGFLVKMSGDLLELA (SEQ ID NO:3)). Por ejemplo, la porción de enlace de antígeno se enlaza específicamente con un epítipo dentro de los aminoácidos 123-131 de la SEQ ID NO:1.

Por ejemplo, la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 89-94, 92-97, o 95-101 de la SEQ ID NO:1; la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro de los aminoácidos 106-111, 109-114, 112-117, 115-120, 118-123, 121-126, 124-129, o 127-134 de la SEQ ID NO:1.

En una modalidad particular, la porción de enlace de antígeno se enlaza específicamente con un epítipo dentro del pro-dominio de

la PCSK9 humana dentro o traslapándose con los aminoácidos 101-107 de la SEQ ID NO:1 (aminoácidos QAARRGY).

En otra modalidad, la porción de enlace de antígeno se enlaza específicamente con un epítipo dentro del pro-dominio de la PCSK9 humana dentro o traslapándose con los aminoácidos 123-132 de la SEQ ID NO:1 (aminoácidos LVKMSGDLLE). Estos aminoácidos caen dentro de los aminoácidos 106-134 del pro-dominio de PCSK9 (SEQ ID NO:3; GYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELA).

En otra modalidad, la porción de enlace de antígeno se enlaza específicamente con PCSK9 dentro de los aminoácidos 101-132 de la SEQ ID NO:1 (es decir, se enlaza con un epítipo dentro de la SEQ ID NO:2, un epítipo dentro de la SEQ ID NO:3, o un epítipo que traslapa las SEQ ID NOs: 2 y 3, es decir, incluye cuando menos un aminoácido de las SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3).

En otra modalidad, la porción de enlace de antígeno se enlaza específicamente con PCSK9 dentro de los aminoácidos 101-132 de la SEQ ID NO:1 y comprende cuando menos un aminoácido de la SEQ ID NO:2 (por ejemplo, glutamina) y cuando menos un aminoácido de la SEQ ID NO:3 (por ejemplo, glicina y/o tirosina).

En otra modalidad, la porción de enlace de antígeno se enlaza específicamente con PCSK9 dentro de los aminoácidos 101-132 de la SEQ ID NO:1 y comprende cuando menos un aminoácido de la SEQ ID NO:2 (por ejemplo, glutamina) y cuando menos un aminoácido de la SEQ ID NO:3 (por ejemplo, glicina y/o tirosina).

En otra modalidad, la porción de enlace de antígeno se enlaza

W

específicamente con PCSK9 en un epítipo que traslapa cuando menos un aminoácido de la SEQ ID NO:2 (por ejemplo, glutamina) y cuando menos un aminoácido de la SEQ ID NO:3 (por ejemplo, glicina y/o tirosina).

5 En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de enlace de PCSK9 aislada que compite cruzadamente por el enlace con cualquiera de las moléculas de enlace de PCSK9 anteriormente mencionadas. De conformidad con lo anterior, estas moléculas de enlace que compiten cruzadamente, por ejemplo, pueden interferir
10 con el enlace (por ejemplo, de un anticuerpo u otra molécula de enlace de PCSK9 que comprenda una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo que se enlace) con los aminoácidos 101-107 o 123-132 de la SEQ ID NO:1, mediante el enlace con epítopos espacialmente próximos.

15 En diferentes modalidades, la molécula de enlace de PCSK9 (por ejemplo, la molécula de enlace de PCSK9 que se enlaza con un epítipo dentro del dominio catalítico, dentro del dominio rico en cisteína, o dentro del pro-dominio) reacciona cruzadamente con una PCSK9 de un primate no humano (por ejemplo, un mono cinomolgo, o
20 un mono Rhesus). En diferentes modalidades, la porción de enlace de antígeno reacciona cruzadamente con una PCSK9 de una especie de roedor (por ejemplo, PCSK9 de murino, PCSK9 de rata).

 En diferentes modalidades, la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo lineal.

25 En diferentes modalidades, la porción de enlace de antígeno se

enlaza con un epítopo no lineal. En un ejemplo, la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítopo no lineal que incluye, o que consiste en, cuando menos una porción de cada uno de los siguientes epítopos lineales: (a) aminoácidos 89-101 de la SEQ ID NO:1; y (b) aminoácidos 106-134 de la SEQ ID NO:1. En otro ejemplo, la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítopo no lineal que incluye, o que consiste en, cuando menos una porción de cada uno de los siguientes epítopos lineales: (a) aminoácidos 166-177 de la SEQ ID NO:1; y (b) aminoácidos 443-458 de la SEQ ID NO:1. En todavía otro ejemplo, la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítopo no lineal que incluye, o que consiste en, cuando menos una porción de dos o tres de los siguientes epítopos lineales: (a) aminoácidos 187-202 de la SEQ ID NO:1; (b) aminoácidos 231-246 de la SEQ ID NO:1; y (c) aminoácidos 368-383 de la SEQ ID NO:1. En otro ejemplo, la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítopo no lineal que incluye, o que consiste en, cuando menos una porción de cada uno de los siguientes epítopos lineales: (a) aminoácidos 206-219 de la SEQ ID NO:1; y (b) aminoácidos 277-283 de la SEQ ID NO:1. En otro ejemplo, la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítopo no lineal que incluye, o que consiste en, cuando menos una porción de cada uno de los siguientes epítopos lineales: (a) aminoácidos 336-349 de la SEQ ID NO:1; y (b) aminoácidos 426-439 de la SEQ ID NO:1. En otro ejemplo, la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítopo no lineal que incluye, o que consiste en, cuando

menos una porción de dos o tres de los siguientes epítopos lineales:

(a) aminoácidos 459-476 de la SEQ ID NO:1; (b) aminoácidos 486-500 de la SEQ ID NO:1; y (c) aminoácidos 557-573 de la SEQ ID NO:1. En otro ejemplo, la porción de enlace de antígeno se enlaza

5 con un epítipo no lineal que incluye, o que consiste en, cuando menos una porción de dos o tres de los siguientes epítopos lineales: (a) aminoácidos 577-590 de la SEQ ID NO:1; (b) aminoácidos 636-645 de la SEQ ID NO:1; y (c) aminoácidos 659-677 de la SEQ ID NO:1.

10 En una modalidad particular, la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo no lineal (por ejemplo, un epítipo de conformación) que comprende todos o una porción de (a) aminoácidos 101-107 de la SEQ ID NO:1; y (b) aminoácidos 123-132 de la SEQ ID NO:1.

15 En diferentes modalidades, la eficacia del enlace de las moléculas de enlace de PCSK9 se correlaciona con la localización del enlace dentro de un dominio o epítipo particular de PCSK9.

En diferentes modalidades, la porción de enlace de antígeno de la molécula de enlace de PCSK9 se enlaza a PCSK9 con una
20 constante de disociación (K_D) igual o menor que 10 nM, 1 nM, 0.5 nM, 0.25 nM, o 0.1 nM.

En diferentes modalidades, la porción de enlace de antígeno de la molécula de enlace de PCSK9 se enlaza con la PCSK9 de un primate no humano (por ejemplo, mono cinomolgo o chimpancé) con
25 una K_D igual o menor que 0.3 nM.

M

En diferentes modalidades, la porción de enlace de antígeno se enlaza a la PCSK9 de ratón con una K_D igual o menor que 0.5 nM.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico (por ejemplo, humanizado) o un anticuerpo humano, o un anticuerpo "humaneered" (humano-diseñado).

En una modalidad, la porción de enlace de antígeno es una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo humano.

La porción de enlace de antígeno puede ser una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo monoclonal o de un anticuerpo policlonal.

La molécula de enlace de PCSK9 incluye, por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento $F(ab')_2$, o un fragmento Fv del anticuerpo.

En una modalidad, la molécula de enlace de PCSK9 es un anticuerpo humano.

En una modalidad, la molécula de enlace de PCSK9 incluye un Fv de una sola cadena.

En una modalidad, la molécula de enlace de PCSK9 incluye a diacuerpo (por ejemplo, un diacuerpo de una sola cadena, o un diacuerpo que tiene dos cadenas de polipéptido).

En algunas modalidades, la porción de enlace de antígeno del anticuerpo se deriva a partir de un anticuerpo de uno de los siguientes isotipos: IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas modalidades, la porción de enlace de antígeno del anticuerpo se deriva a partir de un anticuerpo de un isotipo IgA o IgE.

La molécula de enlace de PCSK9 (por ejemplo, la molécula de enlace de PCSK9 que se enlaza con un epítipo dentro del dominio catalítico, dentro del dominio rico en cisteína, o dentro del pro-dominio) puede exhibir una o más de un número de actividades biológicas. En diferentes modalidades, la molécula de enlace de PCSK9 inhibe el enlace de PCSK9 con un ligando de PCSK9. En algunas modalidades, la molécula de enlace de PCSK9 inhibe el enlace con el ligando de PCSK9 a un pH de 7-8. En algunas modalidades, la molécula de enlace de PCSK9 inhibe el enlace a un pH menor de un pH de 7 (por ejemplo, a un pH de 5 a 7). Por ejemplo, la molécula de enlace de PCSK9 inhibe el enlace de PCSK9 con el ligando de PCSK9 por cuando menos 5 por ciento, 10 por ciento, 15 por ciento, 25 por ciento, o 50 por ciento, en relación con un control (por ejemplo, en relación con el enlace en ausencia de la molécula de enlace de PCSK9).

Por ejemplo, la molécula de enlace de PCSK9 puede inhibir el enlace de PCSK9 con un receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R) (por ejemplo, la molécula de enlace de PCSK9 inhibe el enlace de PCSK9 con LDL-R a un pH de 7 y a un pH más bajo, por ejemplo, a un pH de 5 a 7).

El pro-dominio de PCSK9 se disocia de, y permanece no covalentemente asociado con, el polipéptido maduro de PCSK9. En una modalidad, una molécula de enlace de PCSK9 compete con un pro-dominio de PCSK9 por el enlace con el dominio catalítico o rico en cisteína (o *viceversa*), e inhibe una actividad biológica de PCSK9.

En algunas modalidades, la molécula de enlace de PCSK9 inhibe la actividad proteolítica de PCSK9 (por ejemplo, la proteólisis del pró-dominio de PCSK9, o de otro sustrato de PCSK9). Por ejemplo, la molécula de enlace de PCSK9 inhibe la actividad proteolítica de PCSK9 por cuando menos 5 por ciento, 10 por ciento, 15 por ciento, 25 por ciento, o 50 por ciento, en relación con un control (por ejemplo, en relación con la actividad en ausencia de la molécula de enlace de PCSK9).

En algunas modalidades, la molécula de enlace de PCSK9 inhibe una disminución de LDL-R dependiente de PCSK9 (por ejemplo, la degradación de LDL-R dependiente de PCSK9) en una célula, por ejemplo, un hepatocito. Por ejemplo, la molécula de enlace de PCSK9 inhibe una disminución de LDL-R dependiente de PCSK9 por cuando menos 5 por ciento, 10 por ciento, 15 por ciento, 25 por ciento, o 50 por ciento, en relación con un control (por ejemplo, en relación con la disminución de LDL-R en ausencia de la molécula de enlace de PCSK9). En estas modalidades, un aumento en los niveles de LDL-R indica que la molécula de enlace de PCSK9 inhibe la disminución de LDL-R dependiente de PCSK9.

En ciertas modalidades, una molécula de enlace de PCSK9, cuando se pone en contacto con una célula, por ejemplo, un hepatocito, bajo condiciones en donde esté presente la PCSK9, aumenta la absorción de LDL-c por parte del hepatocito, en relación con la absorción de LDL-c por parte de un hepatocito en ausencia de la molécula de enlace de PCSK9. Por ejemplo, la molécula de

enlace de PCSK9 aumenta la absorción de LDL-c por, cuando menos 5 por ciento, 10 por ciento, 15 por ciento, 25 por ciento, o 50 por ciento, en relación con un control (por ejemplo, en relación con el enlace en ausencia de la molécula de enlace de PCSK9).

5 La molécula de enlace de PCSK9 puede enlazarse con PCSK9 en la presencia de LDL-c y/o puede enlazarse con PCSK9 en la presencia de suero (por ejemplo, en la presencia de cuando menos 1 por ciento, 5 por ciento, 10 por ciento, 25 por ciento, 50 por ciento, de suero).

10 La invención también proporciona moléculas de enlace de PCSK9 que no son anticuerpos. Una molécula de enlace de PCSK9 que no es anticuerpo incluye un dominio de enlace de PCSK9 que tiene una secuencia de aminoácidos derivada a partir de un pliegue de tipo inmunoglobulina (tipo-Ig) de un polipéptido que no es
15 anticuerpo, tal como uno de los siguientes: tenascina, N-cadherina, E-cadherina, ICAM, titina, receptor de GCSF, receptor de citoquina, inhibidor de glicosidasa, antibiótico de cromoproteína, molécula de adhesión de membrana de mielina P0, CD8, CD4, CD2, MHC clase I, receptor de antígeno de células-T, dominios de establecimiento CD1, C2, e I de VCAM-1, dominio de inmunoglobulina de establecimiento-I
20 de proteína C de enlace de miosina, dominio de inmunoglobulina de establecimiento-I de proteína H de enlace de miosina, dominio de inmunoglobulina de establecimiento-I de telocquina, NCAM, twitchina, neuroglian, receptor de hormona de crecimiento, receptor de
25 eritropoietina, receptor de prolactina, receptor de interferón-gamma,

β -galactosidasa/ glucuronidasa, β -glucuronidasa, transglutaminasa, receptor de antígeno de células-T, dismutasa de superóxido, dominio de factor de tejido, citocromo F, proteína fluorescente verde, GroEL, o taumatina. En general, la secuencia de aminoácidos del dominio de enlace de PCSK9 se altera, en relación con la secuencia de aminoácidos del pliegue de tipo inmunoglobulina, de tal manera que el dominio de enlace de PCSK9 se enlaza específicamente con la PCSK9 (es decir, en donde el pliegue de tipo inmunoglobulina no se enlaza específicamente con la PCSK9).

En diferentes modalidades, la secuencia de aminoácidos del dominio de enlace de PCSK9 es cuando menos 60 por ciento idéntica (por ejemplo, cuando menos 65 por ciento, 75 por ciento, 80 por ciento, 85 por ciento, o 90 por ciento idéntica) a una secuencia de aminoácidos de un pliegue de tipo inmunoglobulina de una fibronectina, un receptor de citoquina, o una cadherina.

En diferentes modalidades, la secuencia de aminoácidos del dominio de enlace de PCSK9 es cuando menos 60 por ciento, 65 por ciento, 75 por ciento, 80 por ciento, 85 por ciento, o 90 por ciento idéntica a una secuencia de aminoácidos de un pliegue de tipo inmunoglobulina de uno de los siguientes: tenascina, N-cadherina, E-cadherina, ICAM, titina, receptor de GCSF, receptor de citoquina, inhibidor de glicosidasa, antibiótico de cromoproteína, molécula de adhesión de membrana de mielina P0, CD8, CD4, CD2, MHC clase I, receptor de antígeno de células-T, dominios CD1, C2, y del conjunto I de VCAM-1, dominio de inmunoglobulina de establecimiento-I de

proteína C de enlace de miosina, dominio de inmunoglobulina de establecimiento-I de proteína H de enlace de miosina, dominio de inmunoglobulina de establecimiento-I de telocquina, NCAM, twitchina, neuroglian, receptor de hormona de crecimiento, receptor de
 5 eritropoietina, receptor de prolactina, receptor de interferón-gamma, β -galactosidasa/ glucuronidasa, β -glucuronidasa, transglutaminasa, receptor de antígeno de células-T, dismutasa de superóxido, dominio de factor de tejido, citocromo F, proteína fluorescente verde, GroEL, o taumatina.

10 En diferentes modalidades, el dominio de enlace de PCSK9 se enlaza con la PCSK9 con una K_D igual o menor que 10 nM (por ejemplo, 1 nM, 0.5 nM, 0.1 nM).

En algunas modalidades, el pliegue de tipo Ig es un pliegue de tipo Ig de una fibronectina, por ejemplo, un pliegue de tipo Ig de
 15 fibronectina tipo III (por ejemplo, un pliegue de tipo Ig del módulo 10 de fibronectina III).

La invención también proporciona péptidos que corresponden a los epítomos antigénicos de PCSK9. En un aspecto, la invención proporciona un péptido que consiste en una secuencia de
 20 aminoácidos cuando menos 90 por ciento idéntica a una de las siguientes secuencias de aminoácidos: YRADEYQPPDGG (SEQ ID NO:4); TSIQSDHREIEGRVMV (SEQ ID NO:5); ENVPEEDGTRFHRQ (SEQ ID NO:6); AGVVSGRDAGVAKGAS (SEQ ID NO:7); VQPVGPL (SEQ ID NO:8); VGATNAQDQPVTLG (SEQ ID NO:9); IIGASSDCSTCF
 25 VSQS (SEQ ID NO:10); EAWFPEDQQRVLTPN (SEQ ID NO:11);

190

ALPPSTHGAGWQLFCR (SEQ ID NO:12); TVWSAHSGPTRMATAIAR
(SEQ ID NO:13); CSSFSRSGKRRGERM (SEQ ID NO:14);
HVLTCSSHWEVEDLGT (SEQ ID NO:15); PVLPRGQPNQCVG
(SEQ ID NO:16); SALPGTSHVL (SEQ ID NO:17); RDVSTTGSTSEE
5 AVTAVAI (SEQ ID NO:18); SQSERTARRLQAQ (SEQ ID NO:2); o
GYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELA (SEQ ID NO:3).

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones para
reproducir anticuerpos que se enlazan específicamente con PCSK9,
cuando la composición se administra a un animal. Las
10 composiciones incluyen, por ejemplo, uno de los siguientes péptidos:
YRADEYQPPDGG (SEQ ID NO:4); TSIQSDHREIEGRVMV (SEQ ID
NO:5); ENVPEEDGTRFHRQ (SEQ ID NO:6); AGVVSGRDAGVAKGAS
(SEQ ID NO:7); VQPVGPL (SEQ ID NO:8); VGATNAQDQPVTLG
(SEQ ID NO:9); IIGASSDCSTCFVSQS (SEQ ID NO:10);
15 EAWFPEDQRVLTPN (SEQ ID NO:11); ALPPSTHGAGWQLFCR (SEQ
ID NO:12); TVWSAHSGPTRMATAIAR (SEQ ID NO:13);
CSSFSRSGKRRGERM (SEQ ID NO:14); HVLTCSSHWEVEDLGT
(SEQ ID NO:15); PVLPRGQPNQCVG (SEQ ID NO:16);
SALPGTSHVL (SEQ ID NO:17) RDVSTTGSTSEEAVTAVAI (SEQ ID
20 NO:18); SQSERTARRLQAQ (SEQ ID NO:2); GYLTKILHVFHGLLP
GLVKMSGDLLELA (SEQ ID NO:3); un péptido de los mismos con
menos de 5 cambios de aminoácidos; o un fragmento de los mismos
(por ejemplo, fragmentos que contienen 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12
aminoácidos). El péptido se puede modificar para aumentar la
25 antigenicidad, por ejemplo, mediante el acoplamiento con una

14

proteína portadora.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que incluye una molécula de enlace de PCSK9 descrita en la presente. La composición incluye, por ejemplo, una molécula de enlace de PCSK9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona métodos para utilizar las moléculas de enlace de PCSK9 descritas en la presente.

Por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona un método para aumentar los niveles de LDL-R en una célula, por ejemplo, un hepatocito. El método incluye poner en contacto el hepatocito con una molécula de enlace de PCSK9 (por ejemplo, una molécula de enlace de PCSK9 que incluye una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo que se enlaza específicamente a una PCSK9), reduciendo de esta manera la disminución de LDL-R por PCSK9, y aumentando los niveles de LDL-R en el hepatocito.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para aumentar la absorción de LDL-c por una célula, por ejemplo, un hepatocito. El método incluye poner en contacto el hepatocito con una molécula de enlace de PCSK9 (por ejemplo, una molécula de enlace de PCSK9 que incluye una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo que se enlaza específicamente a una PCSK9), reduciendo de esta manera la disminución de LDL-R por PCSK9, y aumentando la absorción de LDL-c por el hepatocito.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para modular la actividad de PCSK9 en un sujeto. El método incluye

administrar al sujeto una molécula de enlace de PCSK9 (por ejemplo, una molécula de enlace de PCSK9 que incluye una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo que se enlaza específicamente a una PCSK9) que modula una actividad biológica de la PCSK9. La

5 molécula de enlace de PCSK9 exhibe una o más de las siguientes actividades: (a) inhibir el enlace de PCSK9 con un LDL-R; (b) inhibir la actividad proteolítica de la PCSK9; (c) inhibir la disminución de LDL-R dependiente de PCSK9 en un hepatocito; y (d) inhibir la degradación de LDL-R dependiente de PCSK9 en células de

10 hepatocitos.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir el colesterol en plasma en un sujeto. El método incluye administrar al sujeto una composición farmacéutica que incluye una molécula de enlace de PCSK9 descrita en la presente, en una

15 cantidad efectiva para reducir el colesterol en plasma en el sujeto. La cantidad puede ser una cantidad efectiva para reducir el LDL-c. La concentración de LDL-c en plasma del sujeto se puede reducir por cuando menos 5 por ciento, en relación con el LDL-c en plasma antes de administrar la composición (por ejemplo, la concentración

20 de LDL-c en plasma se reduce por cuando menos 10 por ciento, 15 por ciento, o 20 por ciento). En algunas modalidades, el sujeto también está recibiendo terapia con un segundo agente reductor del colesterol, tal como una estatina.

En diferentes modalidades, el sujeto tiene, o está en riesgo de

25 tener, un trastorno de lípidos (por ejemplo, hiperlipidemia, tipo I,

hiperlipidemia tipo II, tipo III, tipo IV, o tipo V, hipertrigliceridemia secundaria, hipercolesterolemia, xantomatosis, deficiencia de acetiltransferasa de colesterol). Por ejemplo, el sujeto es hipercolesterolémico, o está en riesgo de tener hipercolesterolemia; el sujeto tiene, o está en riesgo de tener, aterosclerosis; el sujeto tiene, o está en riesgo de tener, un trastorno cardiovascular.

En algunas modalidades, el sujeto es intolerante a la estatina (por ejemplo, el sujeto sufre de efectos secundarios adversos cuando toma un fármaco de estatina), y/o el sujeto es resistente a la terapia con estatina. (Por ejemplo, la terapia con estatina no provocó una reducción del colesterol en el sujeto).

En algunas modalidades, el nivel de colesterol en plasma total del sujeto es de 200 miligramos/decilitro o mayor, antes de la administración de la composición.

En algunas modalidades, el nivel de LDL-c en plasma del sujeto es de 160 miligramos/decilitro o mayor, antes de la administración de la composición.

En algunas modalidades, la composición se administra intravenosamente.

En algunas modalidades, las moléculas de enlace de PSCK9 se pueden utilizar para preparar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con altos niveles de colesterol.

Los detalles de una o más modalidades de la invención se estipulan en los dibujos adjuntos y en la siguiente descripción. Otras características, objetos, y ventajas de la invención serán aparentes a

partir de la descripción y de los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un diagrama esquemático de la PCSK9 humana, que indica la localización del péptido de señal, del pro-dominio, del dominio catalítico, y del dominio C-terminal (rico en cisteína) en la secuencia lineal.

La Figura 2 es una ilustración de un modelo estructural tridimensional de la PCSK9 humana. Los números indican la localización de los epítomos enlistados en la Tabla 2.

La Figura 3 ilustra los resultados de los estudios de afinidad de enlace Biacore del enlace de H1-Fab con hPCSK9. Los sensogramas (líneas negras dentadas) son las curvas de enlace de H1-Fab en concentraciones de 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, y 12.5 nM. El ajuste global de 1:1 (líneas negras lisas) da los siguientes parámetros de enlace: $k_d = 3.41 \times 10^{-3}$ (1/s), $k_a = 3.23 \times 10^5$ (1/Ms), y $K_D = 1.05 \times 10^{-8}$ (M).

Las Figuras 4A-C ilustran que H1-Fab puede (4A) alterar la interacción de hPCSK9/LDL-R y conducir a (4B) mayores niveles de LDL-R superficial y (4C) mayor absorción de LDL por parte de las células HepG2.

Las Figuras 5A-C ilustran el esquema de conexión de fluido de un sistema automatizado de espectrometría de masas de intercambio de deuterio (DXMS). En las Figuras 5A, 5B, y 5C, respectivamente, se ilustran las posiciones de la válvula para la fase de carga/proteólisis en línea, la etapa de desalinización, y la etapa de

separación del experimento.

La Figura 6 es un esquema que ilustra los experimentos de intercambio complementarios de hidrógeno/deuterio (H/D) (es decir, experimentos de protección, control, e In-D₂O), y los resultados esperados.

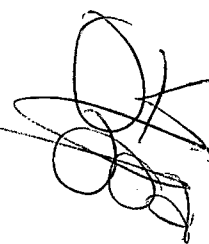
Las Figuras 7A-B ilustran el cambio observado en la deuteración como una función del número de residuos de hPCSK9 para (A) los experimentos de protección, y (B) los experimentos de In-D₂O llevados a cabo sobre hPCSK9 y el complejo hPCSK9:H1-Fab.

La Figura 8 ilustra la estructura del cristal en dibujo de la hPCSK9 con los dos estiramientos de aminoácidos (es decir, los residuos de aminoácidos 101-107 (QAARRGY) y 123-132 (LVKMSGDLLE)) predichos para formar un epítipo no lineal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona moléculas que se enlazan con PCSK9 ("moléculas de enlace de PCSK9"), en particular los anticuerpos humanos y porciones de los mismos que se enlazan con la PCSK9 humana y modulan sus funciones. En la presente también se proporcionan los epítopos de PCSK9 y los agentes que se enlazan con estos epítopos.

La secuencia de longitud completa de la PCSK9 humana (hPCSK9) se encuentra bajo Genbank® Número de Acceso GI:119627065, gb|EAX06660.1, y se muestra en la Tabla 1 como la SEQ ID NO: 1. Una secuencia de ARNm que codifica la hPCSK9 se encuentra bajo el Número de Acceso GI:31317306, NM_174936.



Organización y
Digitalización CSA Ltd.

PATENTE

DE

INVENCION

09-112535

2/2

176

Tabla 1. Secuencia de Aminoácidos de la PCSK9 Humana

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDDGDYEELVLALRSE
 EDGLAEAPEHGTATFHRCAKDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTAR
 RLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEED
 5 SSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHRE
 IEGRVMVTD FENVPEEDGTRFHRQASKCD SHGTHLAGVVSGRDAGVA
 KGASMRSLRVLN CQGKGT VSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVVLLPLAG
 GYSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATN
 AQDQPVTLGTLGTNFGRCVDLFAPGEDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQA
 10 AAHVAGIAAMMLSAEPELT LAELRQRLIHFS AKDVINEAWFPEDQRVLTP
 NLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAIARCAPDEELLSC
 SSFSRSGKRRGERMEAQGGKLCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQAN
 CSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSSHWEVEDLGTHKPPVLR
 PRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQT VACEE
 15 GWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEEAVTAVAI
 CCRSRHLAQASQELQ (SEQ ID NO:1)

En la Figura 1 se muestran las localizaciones del péptido de
 señal, del pro-dominio, del dominio catalítico, y del dominio C-
 terminal rico en cisteína en la secuencia lineal de la de la SEQ ID
 20 NO:1. La PCSK9 humana está N-glicosilada en N533. Está sulfatada
 en Y53 y en el dominio catalítico (proteasa). La concentración de
 hPCSK9 en el plasma humano está en el intervalo de 50 a
 600 nanogramos/mililitro (Lagace y colaboradores, 2006 *J. Clin. Inv.*
 116(11): 2995-3005). Ciertas mutaciones en hPCSK9 están
 25 asociadas con niveles de LDL-c elevados y reducidos en plasma

V29

(Horton y colaboradores, 2006 *Trends. Biochem. Sci.* 32(2): 71-77).

Las siguientes mutaciones están asociadas con LDL-c elevado:

S127R, F216L, D374Y, N425S, y R496W. Las siguientes mutaciones

están asociadas con LDL-c reducido: R46L, Δ R97, G106R, Y142X,

5 L253F, A443T, y C679X.

Las secuencias de aminoácidos de PCSK9 de chimpancé se encuentran en Genbank® bajo el Número de Acceso GI:114556790,

XP_001154126; y el Número de Acceso GI:114556788, XP_513430.

La secuencia de aminoácidos de PCSK9 de ratón se encuentra bajo

10 el Número de Acceso GI:23956352, NP_705793. La secuencia de

aminoácidos de la PCSK9 de rata se encuentra bajo el Número de

Acceso GI:77020250, NP_954862. La secuencia de aminoácidos de

hPCSK9 es 98.7 por ciento idéntica a la PCSK9 de chimpancé, 79.5

por ciento idéntica a la PCSK9 de rata, y 78.9 por ciento idéntica a la

15 PCSK9 de ratón.

Las secuencias de aminoácidos de los epítomos antigénicos de

hPCSK9 y su posición dentro de la secuencia de hPCSK9 de la SEQ

ID NO:1 se enlistan en la Tabla 2.

20 **Tabla 2. Epítomos antigénicos de hPCSK9**

#	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:	Dominio	Posición
1	SQSERTARRLQAQ	2	Pro	89-101
2	GYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDL	3	Pro	106-134

25

#	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:	Dominio	Posición
	LELA			
3	YRADEYQPPDGG	4	Cat	166-177
4	TSIQSDHREIEGRVMV	5	Cat	187-202
5	ENVPEEDGTRFHRQ	6	Cat	206-219
6	AGVVSGRDAGVAKGAS	7	Cat	231-246
7	VQPVGPL	8	Cat	277-283
8	VGATNAQDQPVTLG	9	Cat	336-349
9	IIGASSDCSTCFVSQS	10	Cat	368-383
10	EAWFPEDQRVLTPN	11	Cat	426-439
11	ALPPSTHGAGWQLFCR	12	cat/crd	443-458
12	TVWSAHSGPTRMATAIAR	13	Crd	459-476
13	CSSFSGKRRGERM	14	Crd	486-500
14	HVLTGCSSHWEVEDLGT	15	Crd	557-573
15	PVLRPRGQPNQCVG	16	Crd	577-590
16	SALPGTSHVL	17	Crd	636-645
17	RDVSTTGSTSEEAVTAVAI	18	Crd	659-677

pro=pro-dominio, cat= dominio catalítico, crd= dominio rico en
cisteína

La Figura 2 es una ilustración del modelo estructural tridimensional de hPCSK9. Los siguientes conjuntos de epítomos lineales están proximales en el modelo tridimensional: región 1 en el pro-dominio (SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3); región 2 en el dominio catalítico y en el dominio catalítico/rico en cisteína (SEQ ID NO 4 y
5 SEQ ID NO 12); región 3 en el dominio catalítico (SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 10); región 4 en el dominio catalítico (SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 8); región 5 en el dominio catalítico (SEQ ID NO 9 y SEQ ID NO 11); región 6 en el dominio rico en cisteína (SEQ ID
10 NO 13, SEQ ID NO 14 y SEQ ID NO 15); y región 7 en el dominio rico en cisteína (SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 17 y SEQ ID NO 18).

Los residuos de aminoácidos en estos conjuntos de epítomos forman epítomos no lineales.

El término "anticuerpo", como se utiliza en la presente, se
15 refiere a un anticuerpo intacto o a un fragmento de enlace de antígeno (es decir, "porción de enlace de antígeno"), o una sola cadena (es decir, cadena ligera o pesada) del mismo. Un anticuerpo intacto es una glicoproteína que comprende cuando menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas
20 mediante enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada está comprendida de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H), y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida
25 de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente

como V_L), y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida de un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas como regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas como regiones de estructura (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres regiones determinantes de complementariedad y cuatro regiones de estructura configuradas desde el término amino hasta el término carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar el enlace de la inmunoglobulina a los tejidos o factores huésped, incluyendo diferentes células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

El término "porción de enlace de antígeno" de un anticuerpo, como se utiliza en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto, que retienen la capacidad para enlazarse específicamente con un antígeno dado (por ejemplo, hPCSK9). Las funciones de enlace de antígeno de un anticuerpo pueden ser realizadas por fragmentos de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de los fragmentos de enlace abarcados dentro del término "porción de enlace de antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y

CH1; un fragmento $F(ab)_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab (en general uno a partir de una cadena pesada y uno a partir de una cadena ligera) enlazados por un puente de disulfuro en la región de articulación; un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; un anticuerpo de un solo dominio (dAb) (Ward y colaboradores, 1989 *Nature* 341:544-546), el cual consiste en un dominio V_H ; y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada.

Adicionalmente, aunque los dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , son codificados por genes separados, se pueden unir, empleando métodos recombinantes, mediante un enlazador peptídico artificial que les haga formarse como una sola cadena de proteína en donde se emparejan las regiones V_L y V_H para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de una sola cadena (scFv); véase, por ejemplo, Bird y colaboradores, 1988 *Science* 242: 423-426; y Huston y colaboradores, 1988 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 5879-5883). Estos anticuerpos de una sola cadena incluyen una o más "porciones de enlace de antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen empleando técnicas convencionales conocidas por los expertos en este campo, y los fragmentos se rastrean para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

También se pueden incorporar porciones de enlace de antígeno en los anticuerpos de un solo dominio, maxicuerpos, minicuerpos,

132

intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR, y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, 2005, *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1126-1136). Las porciones de enlace de antígeno de los anticuerpos se pueden injertar en andamiajes basados en polipéptidos, tales como Fibronectina tipo III (Fn3) (véase la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,703,199, la cual describe los monocuerpos de polipéptidos de fibronectina).

Las porciones de enlace de antígeno se pueden incorporar en moléculas de una sola cadena que comprendan un par de segmentos Fv en fila (V_H -CH1- V_H -CH1), los cuales, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de enlace de antígeno (Zapata y colaboradores, 1995 *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062; y Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,641,870).

Una "molécula de enlace de PCSK9 aislada", como se utiliza en la presente, se refiere a una molécula de enlace que está sustancialmente libre de moléculas que tengan especificidades antigénicas para antígenos diferentes de PCSK9 (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se enlace específicamente con hPCSK9 está sustancialmente libre de anticuerpos que se enlacen específicamente con antígenos diferentes de hPCSK9). Sin embargo, una molécula de enlace aislada que se enlace específicamente con hPCSK9 puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de PCSK9 de otras especies. Una molécula de enlace está

"purificada" si está sustancialmente libre de material celular.

El término "composición de anticuerpo monoclonal", como se utiliza en la presente, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal exhibe una sola especificidad de enlace y afinidad para un epítipo particular.

El término "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en donde tanto las regiones de estructura como las regiones determinantes de complementariedad se derivan a partir de secuencias de origen humano. Adicionalmente, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva a partir de estas secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro*, o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente, no pretende incluir anticuerpos en donde se han injertado secuencias de regiones determinantes de complementariedad derivadas a partir de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, sobre las secuencias de estructura humanas.

El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a un

M

anticuerpo que exhibe una sola especificidad de enlace que tiene regiones variables en donde tanto las regiones de estructura como las regiones determinantes de complementariedad se derivan a partir de secuencias humanas. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal humano se produce mediante un hibridoma que incluya una célula-B obtenida a partir de un animal transgénico no humano (por ejemplo, un ratón transgénico que tenga un genoma que comprenda un transgén de cadena pesada y un transgén de cadena ligera humanos) fusionado con una célula inmortalizada.

10 El término "anticuerpo humano recombinante", como se utiliza en la presente, incluye cualquier anticuerpo humano que sea preparado, expresado, creado, o aislado por medios recombinantes, tales como un anticuerpo aislado a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que sea transgénico o transcromosómico para los genes de

15 inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos; un anticuerpo aislado a partir de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma; un anticuerpo aislado a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos de combinación recombinantes; y

20 un anticuerpo preparado, expresado, creado, o aislado por cualquier otro medio que involucre empalmar toda o una porción de una secuencia del gen de inmunoglobulina con otra secuencia de ADN. Estos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en donde las regiones de estructura y las regiones determinantes de

25 complementariedad se derivan a partir de secuencias de

inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, estos anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*), y por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan a partir de, y están relacionadas con, las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal del anticuerpo humano en un ser humano.

Como se utiliza en la presente, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE, IgG tal como IgG1 o IgG4) que es codificada por el gen de la región constante de cadena pesada.

Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno", se utilizan de una manera intercambiable en la presente con el término "un anticuerpo que se enlaza específicamente con un antígeno".

Como se utiliza en la presente, una molécula de enlace de PCSK9 (por ejemplo, un anticuerpo o porción de enlace de antígeno del mismo) que "se enlaza específicamente con PCSK9", pretende referirse a una molécula de enlace de PCSK9 que se enlaza con PCSK9 con una K_D de 1×10^{-7} M o menos. Una molécula de enlace de PCSK9 (por ejemplo, un anticuerpo) que "reacciona cruzadamente con un antígeno", pretende referirse a una molécula de enlace de PCSK9 que se enlaza con ese antígeno con una K_D de 1×10^{-6} M o

136

menos. Una molécula de enlace de PCSK9 (por ejemplo, un anticuerpo) que "no reacciona cruzadamente" con un antígeno dado, pretende referirse a una molécula de enlace de PCSK9 que no se enlaza de una manera detectable con el antígeno dado, o que se enlaza con una K_D de 1×10^{-5} M o mayor. En ciertas modalidades, estas moléculas de enlace que no reaccionan cruzadamente con el antígeno, exhiben un enlace esencialmente indetectable contra estas proteínas en los ensayos de enlace convencionales.

Como se utiliza en la presente, el término "alta afinidad", cuando se refiere a un anticuerpo IgG, indica que el anticuerpo tiene una K_D de 10^{-9} M o menos para un antígeno objetivo.

Como se utiliza en la presente, el término "un epítipo dentro o traslapando" residuos de aminoácidos particulares, se refiere a un epítipo que comprende, que consiste en, o que se traslapa con, todos o una porción de estos residuos.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio sobre un antígeno con el cual se enlaza específicamente una molécula de enlace de PCSK9 de la invención. Los epítipos se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el pliegue terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se retienen al exponerse a los solventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por el pliegue terciario típicamente se pierden con el tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye cuando menos 3,

RDX

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen técnicas de este campo, y las descritas en la presente, por ejemplo, cristalografía de rayos-X y resonancia magnética nuclear bidimensional (véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Volumen 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

La presente invención también abarca moléculas de enlace de PCSK9 que se enlazan con (es decir, reconocen) el mismo epítipo que las moléculas de enlace de PCSK9 descritas en la presente. Las moléculas de enlace de PCSK9 que se enlazan con el mismo epítipo, se pueden identificar por su capacidad para competir cruzadamente con (es decir, inhibir competitivamente el enlace de) una molécula de enlace de PCSK9 de referencia por un antígeno objetivo, de una manera estadísticamente significativa. La inhibición competitiva puede ocurrir, por ejemplo, si las moléculas de enlace de PCSK9 se enlazan con epítopos idénticos o estructuralmente similares (por ejemplo, epítopos traslapados), o epítopos espacialmente proximales que, cuando se enlazan, provocan el impedimento estérico entre los anticuerpos.

La inhibición competitiva se puede determinar empleando ensayos de rutina, en donde la molécula de enlace de PCSK9 bajo prueba, inhibe el enlace específico de una molécula de enlace de PCSK9 de referencia con un antígeno común. Se conocen numerosos tipos de ensayos de enlace competitivo, por ejemplo:

radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA),
inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA),
ensayo de competición de emparedado (véase Stahli y
colaboradores, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA de biotina-
5 avidina directa en fase sólida (véase Kirkland y colaboradores, *J.
Immunol.* 137:3614 (1986)); ensayo marcado directo en fase sólida,
ensayo de emparedado marcado directo en fase sólida (véase Harlow
y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press
(1988)); RIA de marca directa en fase sólida utilizando la marca de
10 I-125 (véase Morel y colaboradores, *Mol. Immunol.* 25(1): 7 (1988));
EIA de biotina-avidina directa en fase sólida (Cheung y
colaboradores, *Virology* 176: 546 (1990)); y RIA marcado directo.
(Moldenhauer y colaboradores, *Scand. J. Immunol.* 32: 77 (1990)).
Típicamente, este ensayo involucra el uso de un antígeno purificado
15 enlazado a una superficie sólida o a células que lleven cualquiera de
los mismos, una molécula de enlace de PCSK9 de prueba no
marcada, y una molécula de enlace de PCSK9 de referencia
marcada. La inhibición competitiva se mide mediante la
determinación de la cantidad de marca enlazada a la superficie
20 sólida o a las células en la presencia de la molécula de enlace de
PCSK9 de prueba. Usualmente, la molécula de enlace de PCSK9
competidora está presente en exceso, e inhibirá el enlace específico
de una molécula de enlace de PCSK9 de referencia con un antígeno
común por cuando menos 50-55 por ciento, 55-60 por ciento, 60-65
25 por ciento, 65-70 por ciento 70-75 por ciento o más.

Otras técnicas incluyen, por ejemplo, métodos de mapeo de epítomos, tales como análisis de rayos-X de cristales de antígeno: complejos de molécula de enlace de PCSK9 que proporcionan la resolución atómica del epítomo. Otros métodos monitorean el enlace de la molécula de enlace de PCSK9 con los fragmentos de antígeno o con variaciones mutadas del antígeno, en donde la pérdida del enlace debida a una modificación de un residuo de aminoácido dentro de la secuencia del antígeno con frecuencia se considera como una indicación de un componente de epítomo. En adición, también se pueden emplear los métodos de combinación por computación para el mapeo del epítomo. Estos métodos se apoyan en la capacidad de la molécula de enlace de PCSK9 de interés para aislar por afinidad péptidos cortos específicos a partir de las bibliotecas de péptidos que exhiben fagos de combinación. Entonces los péptidos se consideran como guías para la definición del epítomo correspondiente a la molécula de enlace de PCSK9 utilizada para rastrear la biblioteca de péptidos. Para el mapeo del epítomo, también se han desarrollado algoritmos de computación, los cuales han demostrado que mapean los epítomos discontinuos de conformación.

Como se utiliza en la presente, el término "sujeto" incluye cualquier ser humano o animal no humano.

El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados no humanos, por ejemplo mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, roedores, conejos, ovejas, perros, gatos,

caballos, vacas, aves, anfibios, reptiles, etc.

Se dice que una secuencia de nucleótidos está "optimizada" si se ha alterado para codificar una secuencia de aminoácidos utilizando codones que son preferidos en la producción de células u organismos, en general una célula eucariótica, por ejemplo, una
5 célula de una levadura, tal como *Pichia*, una célula de insecto, una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada se diseña para codificar una secuencia de aminoácidos idéntica o
10 casi idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de partida original, la cual también se conoce como la secuencia "progenitora".

Como se utiliza en la presente, el término "anticuerpos humaneered" significa los anticuerpos que se enlazan con el mismo
15 epítipo, pero que difieren en la secuencia. Las tecnologías de ejemplo incluyen los anticuerpos "humaneered" producidos mediante la tecnología de "humaneering" de Kalobios, en donde la secuencia de la región de enlace de antígeno se deriva, por ejemplo, mediante mutación, en lugar que debido a los reemplazos de aminoácidos
20 conservadores.

En las siguientes subsecciones se describen con mayor detalle diferentes aspectos de la invención.

Los ensayos convencionales para evaluar la capacidad de las moléculas para enlazarse con PCSK9 de diferentes especies, y en
25 particular con los epítipos de PCSK9, son conocidos en este campo,

M

incluyendo, por ejemplo, ELISAs y Western blots. La determinación de si una molécula de enlace de PCSK9 se enlaza con un epítipo específico de PCSK9, puede emplear un ensayo de competición de epítipo peptídico. Por ejemplo, una molécula de enlace de PCSK9 se
5 incuba con un péptido que corresponde a un epítipo de PCSK9 de interés, en concentraciones de saturación del péptido. La molécula de enlace de PCSK9 previamente incubada se prueba para determinar su enlace con la PCSK9 inmovilizada, por ejemplo mediante análisis Biacore®. La inhibición del enlace de PCSK9
10 mediante la incubación previa con el péptido, indica que la molécula de enlace de PCSK9 se enlaza con el epítipo peptídico (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 20070072797). La cinética de enlace también se puede evaluar mediante ensayos convencionales conocidos en la
15 materia, tales como mediante análisis Biacore®. Los ensayos para evaluar los efectos de las moléculas de enlace de PCSK9 sobre las propiedades funcionales de PCSK9, se describen con mayor detalle más adelante.

De conformidad con lo anterior, se entenderá que una molécula
20 de enlace de PCSK9 que "inhibe" una o más de estas propiedades funcionales de PCSK9 (por ejemplo, bioquímicas, celulares, fisiológicas, u otras actividades biológicas, o similares), como se determine de acuerdo con las metodologías conocidas en la técnica y descritas en la presente, producirá una disminución estadísticamente
25 significativa en la propiedad funcional particular en relación con la

que se ve en ausencia de la molécula de enlace (por ejemplo, cuando está presente una molécula de control de una especificidad irrelevante). Una molécula de enlace de PCSK9 que inhibe la actividad de PCSK9, efectúa esta disminución estadísticamente significativa por cuando menos el 5 por ciento del parámetro medido. En ciertas modalidades, un anticuerpo u otra molécula de enlace de PCSK9 puede producir una disminución en la propiedad funcional seleccionada de cuando menos el 10 por ciento, 20 por ciento, 30 por ciento, o 50 por ciento, comparándose con el control. En algunas modalidades, la inhibición de PCSK9 se determina midiendo los niveles de LDL-R. Un aumento en los niveles de LDL-R en la presencia de una molécula de enlace de PCSK9 indica que la molécula de enlace de PCSK9 inhibe PCSK9.

Anticuerpos

Los anticuerpos anti-PCSK9 descritos en la presente incluyen anticuerpos monoclonales humanos. En algunas modalidades, las porciones de enlace de antígeno de los anticuerpos que se enlazan con PCSK9 (por ejemplo, las cadenas V_H y V_L) están "mezcladas y emparejadas" para crear otras moléculas de enlace anti-PCSK9. El enlace de estos anticuerpos "mezclados y emparejados" se puede probar empleando los ensayos de enlace anteriormente mencionados (por ejemplo, ELISAs). Cuando se selecciona una V_H para mezclarse y emparejarse con una secuencia V_L particular, típicamente se selecciona una V_H que sea estructuralmente similar a la V_H que reemplaza en el emparejamiento con la V_L . De la misma manera, una

secuencia de cadena pesada de longitud completa a partir de un emparejamiento particular de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa, generalmente es reemplazada con una secuencia de cadena pesada de longitud completa estructuralmente similar. De la misma manera, una secuencia V_L de un emparejamiento V_H/V_L particular debe ser reemplazada con una secuencia V_L estructuralmente similar. De la misma manera, una secuencia de cadena ligera de longitud completa de un emparejamiento particular de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa, debe ser reemplazada con una secuencia de cadena ligera de longitud completa estructuralmente similar. La identificación de la similitud estructural en este contexto es un proceso bien conocido en la técnica.

En otros aspectos, la invención proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1s, CDR2s, y CDR3s de cadena pesada y de cadena ligera de uno o más anticuerpos de enlace de PCSK9, en diferentes combinaciones. Dado que cada uno de estos anticuerpos puede enlazarse con PCSK9, y que la especificidad de enlace de antígeno es proporcionada primordialmente por las regiones CDR1, 2, y 3, las secuencias de CDR1, 2, y 3 de V_H y las secuencias de CDR1, 2, y 3 de V_L se pueden "mezclar y emparejar" (es decir, las CDRs de diferentes anticuerpos se pueden mezclar y emparejar). El enlace de PCSK9 con estos anticuerpos "mezclados y emparejados" se puede probar utilizando los ensayos de enlace descritos en la presente (por ejemplo, ELISAs). Cuando se mezclan y se emparejan

las secuencias de CDR de V_H , la secuencia CDR1, CDR2, y/o CDR3 de una secuencia V_H particular debe ser reemplazada con una secuencia CDR estructuralmente similar. De la misma manera, cuando se mezclan y se emparejan las secuencias de CDR de V_L , la secuencia CDR1, CDR2, y/o CDR3 de una secuencia V_L particular debe ser reemplazada con una secuencia CDR estructuralmente similar. La identificación de la similitud estructural en este contexto es un proceso bien conocido en este campo.

Como se utiliza en la presente, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada y ligera, o cadenas pesada y ligera de longitud completa, que son "el producto de" o "se derivan de" una secuencia de línea germinal particular, si las regiones variables o las cadenas de longitud completa del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que utilice genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana como la fuente de las secuencias. En uno de estos sistemas, se reproduce un anticuerpo humano en un ratón transgénico que lleve genes de inmunoglobulina humana. El transgénico se inmuniza con el antígeno de interés (por ejemplo, un epítipo de hPCSK9 descrito en la presente). De una manera alternativa, se identifica un anticuerpo humano proporcionando una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana exhibida sobre el fago, y rastreando la biblioteca con el antígeno de interés (por ejemplo, hPCSK9 y el epítipo de hPCSK9 descritos en la presente).

Un anticuerpo humano que sea "el producto de" o que "se

945

derive de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana se puede identificar como tal mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con la secuencia de aminoácidos de las inmunoglobulinas de la línea germinal humana, y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana que esté más cercana en la secuencia (es decir, mayor porcentaje de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que sea "el producto de" o que "se derive de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana particular, puede contener diferencias de aminoácidos, comparándose con la secuencia codificada por la línea germinal, debido, por ejemplo, a las mutaciones somáticas que se presentan naturalmente, o a las mutaciones dirigidas al sitio artificiales. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente tiene una secuencia de aminoácidos cuando menos el 90 por ciento idéntica a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana, y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se comparan con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de la línea germinal de murino). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser cuando menos el 60 por ciento, el 70 por ciento, el 80 por ciento, el 90 por ciento, o cuando menos el 95 por ciento, o todavía cuando menos el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, o el 99 por ciento idéntico en la secuencia de

aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones de identidad compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad = número de posiciones de identidad/número total de posiciones x 100), tomando en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se necesitan introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias, se determina utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (1988 Comput. Appl. Biosci., 4:11-17), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una multa de longitud de hueco de 12, y una multa de hueco de 4.

Típicamente, una V_H o una V_L de un anticuerpo humano derivado a partir de una secuencia de la línea germinal humana particular exhibirá no más de 10 diferencias de aminoácidos a partir de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertos casos, la V_H o la V_L del anticuerpo humano puede exhibir no más de 5, o inclusive no más de cuatro, tres, dos, o una diferencia de aminoácido, a partir de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

Anticuerpos Camélidos

Se han caracterizado proteínas de anticuerpos obtenidas a

47

partir de miembros de la familia de los camellos y dromedarios (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromaderius*), incluyendo los miembros del Nuevo Mundo, tales como las especies de llama (*Lama paccos*, *Lama glama*, y *Lama vicugna*), con respecto al tamaño, la complejidad estructural, y la antigenicidad para sujetos humanos. Ciertos anticuerpos IgG encontrados en la naturaleza en esta familia de mamíferos carecen de cadenas ligeras, y por lo tanto, son estructuralmente distintos de la estructura cuaternaria de cuatro cadenas que tiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras típicas para los anticuerpos de otros animales. Véase la Publicación Internacional Número WO 94/04678.

Se puede obtener una región del anticuerpo camélido que sea el dominio variable individual pequeño identificado como V_{HH} , mediante ingeniería genética, para producir una proteína pequeña que tenga una alta afinidad para un objetivo, dando como resultado una proteína derivada de anticuerpo de bajo peso molecular conocida como un "nanocuerpo camélido". Véase la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,759,808; véase también Stijlemans y colaboradores, 2004 J. Biol. Chem. 279:1256-1261; Dumoulin y colaboradores, 2003 Nature 424:783-788; Pleschberger y colaboradores, 2003 Bioconjugate Chem. 14:440-448; Cortez-Retamozo y colaboradores, 2002 Int. J. Cancer 89:456-62; y Lauwereys y colaboradores, 1998 EMBO J. 17:3512-3520. Las bibliotecas diseñadas de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de camélidos están comercialmente disponibles en, por ejemplo, Ablynx,

Ghent, Bélgica. Como con otros anticuerpos de origen no humano, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo camélido se puede alterar de una manera recombinante para obtener una secuencia que se parezca más estrechamente a una secuencia humana, es decir, el nanocuerpo se puede "humanizar". Por consiguiente, la baja antigenicidad natural de los anticuerpos camélidos para los seres humanos se puede reducir adicionalmente.

El nanocuerpo camélido tiene un peso molecular de aproximadamente una décima parte de aquél de una molécula de IgG humana, y la proteína tiene un diámetro físico de solamente unos cuantos nanómetros. Una consecuencia del pequeño tamaño es la capacidad de los nanocuerpos camélidos para enlazarse con los sitios antigénicos que son funcionalmente invisibles para las proteínas de anticuerpo más grandes, es decir, los nanocuerpos camélidos son útiles como reactivos para detectar los antígenos que son de otra manera crípticos utilizando las técnicas inmunológicas clásicas, y como posibles agentes terapéuticos. Por lo tanto, todavía otra consecuencia del pequeño tamaño, es que un nanocuerpo camélido puede inhibir, como resultado del enlace con un sitio específico en una ranura o hendidura estrecha de una proteína objetivo, y por consiguiente, puede servir en una capacidad que se parezca más estrechamente a la función de un fármaco de bajo peso molecular clásico que aquélla de un anticuerpo clásico.

El bajo peso molecular y el tamaño compacto dan como resultado además nanocuerpos camélidos que son extremadamente

termoestables, estables a un pH extremo y a la digestión proteolítica, y pobremente antigénicos. Otra consecuencia es que los nanocuerpos camélidos se mueven fácilmente desde el sistema circulatorio hacia los tejidos, e inclusive cruzan la barrera hematoencefálica, y pueden tratar trastornos que afecten al tejido nervioso. Los nanocuerpos pueden facilitar adicionalmente el transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Véase la Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 20040161738, publicada el 19 de agosto de 2004. Estas características, combinadas con la baja antigenicidad en seres humanos, indican el gran potencial terapéutico. Además, estas moléculas se pueden expresar completamente en células procarióticas, tales como *E. coli*.

De conformidad con lo anterior, una característica de la presente invención es un anticuerpo camélido o un nanocuerpo camélido que tiene una alta afinidad para PCSK9. En ciertas modalidades de la presente, el anticuerpo o nanocuerpo camélido se produce naturalmente en el animal camélido, es decir, es producido por el camélido en seguida de la inmunización con PCSK9 o con un fragmento peptídico del mismo, empleando las técnicas descritas en la presente para otros anticuerpos. De una manera alternativa, se diseña un nanocuerpo camélido anti-PCSK9, es decir, se produce mediante selección, por ejemplo a partir de una biblioteca de fagos que exhiban proteínas de nanocuerpos camélidos apropiadamente mutadas empleando procedimientos de extensión con PCSK9 o con

un epítipo de PCSK9 descrito en la presente como un objetivo. Los nanocuerpos diseñados pueden hacerse adicionalmente a la medida mediante ingeniería genética para aumentar la vida media en un sujeto receptor desde 45 minutos hasta dos semanas.

5 **Diacuerpos**

Los diacuerpos son moléculas biespecíficas bivalentes en donde los dominios V_H y V_L se expresan sobre una sola cadena de polipéptido, conectada por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena. Los dominios V_H y V_L se emparejan con los dominios complementarios de otra cadena, creando de esta manera dos sitios de enlace de antígeno (véase, por ejemplo, Holliger y colaboradores, 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90:6444-6448; Poljak y colaboradores, 1994 *Structure* 2:1121-1123). Los diacuerpos se pueden producir mediante la expresión de dos cadenas de polipéptido con la estructura $V_{HA}-V_{LB}$ y $V_{HB}-V_{LA}$ (configuración V_H-V_L), ó $V_{LA}-V_{HB}$ y $V_{LB}-V_{HA}$ (configuración V_L-V_H) dentro de la misma célula. La mayoría de ellos se pueden expresar en una forma soluble en bacterias.

Los diacuerpos de una sola cadena (scDb) se producen mediante la conexión de las dos cadenas de polipéptidos que forman el diacuerpo con un enlazador de aproximadamente 15 residuos de aminoácidos (véase Holliger y Winter, 1997 *Cancer Immunol. Immunother.*, 45(3-4):128-30; Wu y colaboradores, 1996 *Immunotechnology*, 2(1):21-36). Los scDb se pueden expresar en

bacterias en una forma monomérica activa soluble (véase Holliger y Winter, 1997 *Cancer Immunol. Immunother.*, 45(34): 128-30; Wu y colaboradores, 1996 *Immunotechnology*, 2(1): 21-36; Pluckthun y Pack, 1997 *Immunotechnology*, 3(2): 83-105; Ridgway y colaboradores, 1996 *Protein Eng.*, 9(7):617-21).

Un diacuerpo se puede fusionar con Fc para generar un "di-diacuerpo" (véase Lu y colaboradores, 2004 *J. Biol. Chem.*, 279(4): 2856-65).

Anticuerpos diseñados y modificados

10 Un anticuerpo de la invención se puede preparar utilizando un anticuerpo que tenga una o más secuencias V_H y/o V_L como material de partida, para diseñar un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas del anticuerpo de partida. Un anticuerpo se puede diseñar mediante la modificación de
15 uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo, dentro de una o más regiones CDR, y/o dentro de una o más regiones de estructura. Adicionalmente o de una manera alternativa, un anticuerpo se puede diseñar mediante la modificación de los residuos dentro de las regiones constantes, por
20 ejemplo, para alterar las funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de diseño de región variable que se puede llevar a cabo es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con los antígenos objetivos predominantemente a través de los residuos de aminoácidos que se localizan en las seis CDRs de cadena pesada y
25 ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las

172

CDRs son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDRs. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones de anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de los anticuerpos específicos que se presentan naturalmente, mediante la construcción de vectores de expresión que incluyan secuencias CDR a partir del anticuerpo específico que se presente naturalmente injertado en las secuencias de estructura de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véanse, por ejemplo, Riechmann y colaboradores, 1998 *Nature* 332: 323-327; Jones y colaboradores, 1986 *Nature* 321: 522-525; Queen y colaboradores, 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 86: 10029-10033; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,225,539, y Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370).

Las secuencias de estructura se pueden obtener a partir de las bases de datos de ADN públicas, o de las referencias publicadas que incluyan secuencias genéticas de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de región variable de cadena pesada y ligera humanos se pueden encontrar en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBase" (disponible en Internet en www.mrccpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat y colaboradores, 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados

103

Unidos, Publicación de NIH Número 91-3242; Tomlinson y colaboradores, 1992 *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox y colaboradores, 1994 *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; incorporándose el contenido de cada uno de los mismos expresamente a la presente como referencia.

Las secuencias CDR1, 2, y 3 de V_H y las secuencias CDR1, 2, y 3 de V_L se pueden injertar en las regiones de estructura que tengan la secuencia idéntica a la que se encuentra en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal a partir del cual se deriva la secuencia de estructura, o las secuencias CDR se pueden injertar en las regiones de estructura que contengan una o más mutaciones, comparándose con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que, en ciertos casos, es benéfico mutar los residuos dentro de las regiones de estructura para mantener o mejorar la capacidad de enlace de antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370).

Las CDRs también se pueden injertar en las regiones de estructura de polipéptidos diferentes de los dominios de inmunoglobulina. Los andamiajes apropiados forman una estructura conformacionalmente estable que recibe los residuos injertados, de tal manera que forman una superficie localizada y se enlazan con el objetivo de interés (por ejemplo, PCSK9). Por ejemplo, las CDRs se pueden injertar en un andamiaje en donde las regiones de estructura se basen en fibronectina, anquirina, lipocalina, neocarcinostatina,

citocromo b, dedo de zinc CP1, PST1, bobina enrollada, LACI-D1, dominio Z o tendramisato (véase, por ejemplo, Nygren y Uhlen, 1997 *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 463-469).

Otro tipo de modificación de la región variable es la mutación de los residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2, y/o CDR3 de V_H y/o V_L , para mejorar de esta manera una o más propiedades de enlace (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés, conocida como "maduración por afinidad". Se puede llevar a cabo mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por reacción en cadena de la polimerasa para introducir las mutaciones, y se puede evaluar el efecto sobre el enlace del anticuerpo u otra propiedad funcional de interés en ensayos *in vitro* o *in vivo*, como se describe en la presente. Se pueden introducir mutaciones conservadoras. Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones, o supresiones de aminoácidos. Más aún, típicamente se alteran más de 1, 2, 3, 4, ó 5 residuos dentro de una región CDR.

Los anticuerpos diseñados de la invención incluyen aquéllos en donde se han hecho modificaciones a los residuos de estructura dentro de V_H y/o V_L , por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, estas modificaciones de estructura se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un planteamiento es "retromutar" uno o más residuos de estructura hasta la secuencia de la línea germinal correspondiente. De una manera más específica, un anticuerpo que haya sufrido mutación somática puede contener residuos de estructura que

PT

difieran de la secuencia de la línea germinal a partir de la cual se deriva el anticuerpo. Estos se pueden identificar mediante la comparación de las secuencias de estructura del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal a partir de las cuales se deriva el anticuerpo. Para regresar a las secuencias de región de estructura hasta su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden "retromutar" hasta la secuencia de la línea germinal, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio o mediante mutagénesis mediada por reacción en cadena de la polimerasa. Estos anticuerpos "retromutados" también están abarcados por la presente invención.

Otro tipo de modificación de estructura involucra la mutación de uno o más residuos dentro de la región de estructura, o inclusive dentro de una o más regiones CDR, para remover los epítomos de células T, con el fin de reducir de esta manera la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este planteamiento también es referido como "desinmunización", y se describe con mayor detalle en la Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 20030153043, por Carr y colaboradores.

En adición o de una manera alternativa a las modificaciones hechas dentro de las regiones de estructura o CDR, los anticuerpos de la invención se pueden diseñar para incluir modificaciones dentro de la región Dc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la vida media en suero, la fijación de complemento, el enlace del receptor, y/o la citotoxicidad

celular dependiente del antígeno. Adicionalmente, un anticuerpo de la invención se puede modificar químicamente (por ejemplo, una o más fracciones químicas se pueden unir al anticuerpo), o se puede modificar para alterar su glicosilación, nuevamente con el fin de
5 alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo.

En una modalidad, se modifica la región de articulación de CH1, de tal manera que se altere el número de residuos de cisteína en la región de articulación, por ejemplo, que se aumente o se disminuya. Este planteamiento se describe adicionalmente en la
10 Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,677,425 por Bodmer y colaboradores. El número de residuos de cisteína en la región de articulación de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamble de las cadenas pesada y ligera, o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

15 En otra modalidad, se muta la región de articulación Fc de un anticuerpo para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. De una manera más específica, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfase del dominio CH2-CH3 del fragmento de articulación Fc, de tal manera que el anticuerpo tenga
20 deteriorado el enlace de proteína A de *Staphylococcy* (SpA) con el enlace SpA del dominio de articulación Fc nativo. Este planteamiento se describe con mayor detalle en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,165,745 por Ward y colaboradores.

En otra modalidad, el anticuerpo se modifica para aumentar su
25 vida media biológica. Son posibles diferentes planteamientos. Por

157

ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,277,375 describe las siguientes mutaciones en una IgG que aumentan su vida media *in vivo*: T252L, T254S, T256F. De una manera alternativa, con el objeto de aumentar la vida media biológica, el anticuerpo se puede alterar dentro de la región CH1 ó CL, para contener un epítipo de enlace de receptor de salvamento tomado a partir de dos ciclos de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,869,046 y 6,121,022 por Presta y colaboradores.

En todavía otras modalidades, se altera la región Fc reemplazando cuando menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente con el fin de alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden ser reemplazados con un residuo de aminoácido diferente, de tal manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada para un ligando efector, pero que retenga la capacidad de enlace de antígeno del anticuerpo progenitor. El ligando efector con el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc, o el componente C1 del complemento. Este planteamiento se describe con mayor detalle en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números ,624,821 y 5,648,260, ambas por Winter y colaboradores.

En otra modalidad, uno o más aminoácidos seleccionados a partir de los residuos de aminoácidos pueden ser reemplazados con un residuo de aminoácido diferente, de tal manera que el anticuerpo

tenga el enlace de C1q alterado, y/o las citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o abolida. Este planteamiento se describe con mayor detalle en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,194,551 por Idusogie y colaboradores.

5 En otra modalidad, se alteran uno o más residuos de aminoácidos para alterar de esta manera la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este planteamiento es descrito adicionalmente en la Publicación Internacional Número WO 94/29351 por Bodmer y colaboradores.

10 En todavía otra modalidad, se modifica la región Fc para aumentar la capacidad del anticuerpo para medir la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo para un receptor de Fcγ, mediante la modificación de uno o más aminoácidos. Este planteamiento se describe adicionalmente en la Publicación Internacional Número WO 00/42072 por Presta. Más aún, se han mapeado los sitios de enlace sobre la IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII, y FcRn, y se han descrito variantes con un mejor enlace (véase Shields, R. L. y colaboradores, 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

20 En todavía otra modalidad, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede hacer un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por un antígeno. Estas modificaciones de carbohidratos se pueden llevar a cabo, por ejemplo, mediante la alteración de uno o más sitios

25

de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de estructura de región variable, para eliminar de esta manera la glicosilación en ese sitio. Esta aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Este planteamiento se describe con mayor detalle en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,714,350 y 6,350,861 por Co y colaboradores.

10 De una manera adicional o alternativa, se puede hacer un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de fucosilo, o un anticuerpo que tenga más estructuras GlcNac de bisección. Se ha demostrado que estos patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Estas modificaciones de carbohidratos se pueden llevar a cabo, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en una célula huésped con una maquinaria de glicosilación alterada. En la técnica se han descrito células con la maquinaria de glicosilación alterada, y se pueden utilizar como células huésped en donde se pueden expresar los anticuerpos recombinantes de la invención, con el objeto de producir de esta manera un anticuerpo con la glicosilación alterada. Por ejemplo, la Patente Europea Número EP 1,176,195 por Hang y colaboradores, describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil-transferasa, de tal

15

20

25

manera que los anticuerpos expresados en esta línea celular exhiben hipofucosilación. La Publicación del TCP Número WO 03/035835 por Presta, describe una línea celular de CHO variante, células Lec13, con una capacidad reducida para unir la fucosa a los carbohidratos enlazados con Asn(297), que también dan como resultado la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields R. L. y colaboradores, 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La Publicación Internacional Número WO 99/54342 por Umana y colaboradores, describe líneas celulares diseñadas para expresar las glicosil-transferasas modificadoras de glicoproteína (por ejemplo, beta-(1,4-N-acetil-glucosaminil-transferasa III (Gn TIII)), de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas exhiben más estructuras GlcNac de bisección, lo cual da como resultado una mayor actividad de ADCC de los anticuerpos (véase también Umana y colaboradores, 1999 Nat. Biotech. 17:176-180).

Otra modificación de los anticuerpos de la presente que es contemplada por la invención es la pegilación. Un anticuerpo se puede pegar, por ejemplo, para aumentar la vida media biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o el fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG, bajo condiciones en donde una o más fracciones de PEG lleguen a unirse con el anticuerpo o con el fragmento de anticuerpo. La pegilación se puede llevar a cabo

101

mediante una reacción de acilación o mediante una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se utiliza en la presente, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas modalidades, el anticuerpo que se va a pegar es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para la pegilación de proteínas son conocidos en este campo, y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente Europea Número EP 0,154,316 por Nishimura y colaboradores, y la Patente Europea Número EP 0,401,384 por Ishikawa y colaboradores.

En adición, la pegilación se puede lograr en cualquier parte de un polipéptido de enlace de PCSK9 de la invención, mediante la introducción de un aminoácido no natural. Se pueden introducir ciertos aminoácidos no naturales mediante la tecnología descrita en Deiters y colaboradores, *J. Am. Chem. Soc.* 125:11782-11783, 2003. Wang y Schultz, *Science* 301:964-967, 2003; Wang y colaboradores, *Science* 292:498-500, 2001; Zhang y colaboradores, *Science* 303:371-373, 2004 o en Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 7,083,970. Dicho de una manera breve, algunos de estos sistemas de expresión involucran mutagénesis dirigida al sitio para introducir un codón sin sentido, tal como un TAG ámbar, en el marco de lectura abierta que codifique un polipéptido de la invención. Entonces se introducen estos vectores de expresión en

un huésped que pueda utilizar un ARNt específico para el codón sin sentido introducido, y se cargan con el aminoácido no natural de elección. Los aminoácidos no naturales particulares que son benéficos para el propósito de conjugar fracciones con los polipéptidos de la invención incluyen aquéllos con cadenas naturales de acetileno y azido. Los polipéptidos que contengan estos aminoácidos novedosos se pueden entonces pegar en estos sitios seleccionados de la proteína.

Métodos para diseñar anticuerpos

10 Como se discute anteriormente, se pueden utilizar anticuerpos anti-PCSK9 para crear nuevos anticuerpos anti-PCSK9 mediante la modificación de las secuencias de cadena pesada y/o de cadena ligera de longitud completa, las secuencias V_H y/o V_L , o las regiones constantes unidas a las mismas. Por ejemplo, una o más regiones

15 CDR de los anticuerpos se pueden combinar de una manera recombinante con las regiones de estructura conocidas y/o con otras CDRs para crear nuevos anticuerpos anti-PCSK9 recombinantemente diseñados. Otros tipos de modificaciones incluyen aquéllas descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de

20 diseño es una o más de las secuencias V_H y/o V_L , o una o más regiones CDR de las mismas. Con el fin de crear el anticuerpo diseñado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresarse como una proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias V_H y/o V_L , o una o más regiones CDR de las mismas. Más

25 bien, se utiliza la información contenida en las secuencias como el

103

material de partida para crear secuencias de una "segunda generación" derivadas a partir de las secuencias originales, y luego las secuencias de "segunda generación" se preparan y se expresan como una proteína.

5 Se pueden emplear las técnicas de biología molecular convencionales para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada. El anticuerpo codificado por las secuencias de anticuerpo alteradas es uno que retiene una, algunas, o todas las propiedades funcionales del anticuerpo anti-PCSK9 a partir del cual se derive,
10 cuyas propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a, enlazarse específicamente con PCSK9, inhibir la disociación auto-catalítica, inhibir en enlace de LDL-R, inhibir la degradación de LDL-R. Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar utilizando ensayos convencionales disponibles en la
15 técnica y/o descritos en la presente (por ejemplo, ELISAs).

 En ciertas modalidades de los métodos para diseñar los anticuerpos de la invención, se pueden introducir mutaciones de una manera aleatoria o selectiva a lo largo de toda o parte de una secuencia de codificación del anticuerpo anti-PCSK9, y los
20 anticuerpos anti-PCSK9 modificados resultantes se pueden rastrear para determinar su actividad de enlace y/u otras propiedades funcionales (por ejemplo, inhibición de la disociación auto-catalítica, inhibición del enlace de LDL-R, inhibición de la degradación de LDL-R), como se describe en la presente. En la técnica se han descrito
25 métodos de mutación. Por ejemplo, la Publicación del TCP Número

WO 02/092780 por Short, describe métodos para crear y rastrear mutaciones de anticuerpos utilizando mutagénesis de saturación, ensamble de ligamiento sintético, o una combinación de los mismos. De una manera alternativa, la Publicación Internacional Número WO 03/074679 por Lazar y colaboradores, describe métodos para utilizar los métodos de rastreo de computación con el fin de optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de enlace de PCSK9 que no son anticuerpos

La invención proporciona además moléculas de enlace de PCSK9 que exhiben propiedades funcionales de los anticuerpos, pero que derivan sus porciones de enlace de antígeno y de estructura a partir de otros polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos diferentes de aquéllos codificados por los genes de anticuerpo, o generados mediante la recombinación de los genes de anticuerpo *in vivo*). Los dominios de enlace de antígeno (por ejemplo, los dominios de enlace de PCSK9) de estas moléculas de enlace, se generan a través de un proceso de evolución dirigida. Véase la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 7,115,396. Las moléculas que tengan un pliegue global similar a aquél de un dominio variable de un anticuerpo (un pliegue de "tipo inmunoglobulina") son proteínas de andamiaje apropiadas. Las proteínas de andamiaje adecuadas para derivar las moléculas de enlace de antígeno incluyen fibronectina o un dímero de fibronectina, tenascina, N-cadherina, E-cadherina, ICAM, titina, receptor de GCSF, receptor de citoquina, inhibidor de glicosidasa, cromoproteína antibiótica,

molécula de adhesión de membrana de mielina P0, CD8, CD4, CD2, MHC clase I, receptor de antígeno de células-T, dominios de establecimiento CD1, C2, y I de VCAM-1, dominio de inmunoglobulina de establecimiento-I de la proteína C de enlace de miocina, dominio de inmunoglobulina de establecimiento-I de la proteína H de enlace de miocina, dominio de inmunoglobulina de establecimiento-I de teloquina, NCAM, twitchina, neuroglian, receptor de hormona de crecimiento, receptor de eritropoietina, receptor de prolactina, receptor de interferón-gamma, β -galactosidasa/ glucuronidasa, β -glucuronidasa, transglutaminasa, receptor de antígeno de células-T, dismutasa de superóxido, dominio de factor de tejido, citocromo F, proteína fluorescente verde, GroEL, y taumatina.

El dominio de enlace de antígeno (por ejemplo, el pliegue de tipo inmunoglobulina) de la molécula de enlace que no es anticuerpo, puede tener una masa molecular menor de 10 kD o mayor de 7.5 kD (por ejemplo, una masa molecular de entre 7.5 y 10 kD). La proteína utilizada para derivar el dominio de enlace de antígeno es una proteína de mamífero que se presenta naturalmente (por ejemplo, una proteína humana), y el dominio de enlace de antígeno incluye hasta el 50 por ciento (por ejemplo, hasta el 34 por ciento, el 25 por ciento, el 20 por ciento, o el 15 por ciento) de aminoácidos mutados, comparándose con el pliegue de tipo inmunoglobulina de la proteína a partir de la cual se deriva. El dominio que tiene el pliegue de tipo inmunoglobulina generalmente consiste en 50 a 150 aminoácidos

(por ejemplo, en 40 a 60 aminoácidos).

Con el objeto de generar moléculas de enlace que no sean anticuerpos, se crea una biblioteca de clones, en donde las secuencias en las regiones de la proteína de andamiaje que forman las superficies de enlace de antígeno (por ejemplo, las regiones análogas en posición y estructura a las CDRs de un pliegue de inmunoglobulina de dominio variable de anticuerpo) se seleccionan aleatoriamente. Los clones de la biblioteca se prueban para determinar su enlace específico con el antígeno de interés (por ejemplo, PCSK9) y para determinar otras funciones (por ejemplo, la inhibición de la actividad biológica de PCSK9). Los clones seleccionados se pueden utilizar como la base de una selección aleatoria adicional, y para la selección con el fin de producir derivados de más alta afinidad por el antígeno.

Las moléculas de enlace de alta afinidad se generan, por ejemplo, utilizando el décimo módulo de fibronectina III ($^{10}\text{Fn3}$) como el andamiaje. Se construye una biblioteca para cada uno de tres ciclos tipo CDR de $^{10}\text{FN3}$ en los residuos 23-29, 52-55, y 78-87. Con el fin de construir cada biblioteca, se seleccionan aleatoriamente segmentos de ADN que codifiquen la secuencia que traslape a cada región tipo CDR, mediante síntesis de oligonucleótidos. Las técnicas para producir bibliotecas de $^{10}\text{Fn3}$ seleccionables se describen en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 6,818,418 y 7,115,396; en Roberts y Szostak, 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci EUA* 94: 12297; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número

107

6,261,804; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,258,558; y Szostak y colaboradores, Publicación Internacional Número WO98/31700.

Las moléculas de enlace que no son anticuerpos se pueden producir como dímeros o multímeros para aumentar la avidéz por el antígeno objetivo. Por ejemplo, el dominio de enlace de antígeno se expresa como una fusión con una región constante (Fc) de un anticuerpo que forma los dímeros Fc-Fc. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 7,115,396.

10 **Moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención**

Otro aspecto de la invención pertenece a las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de enlace de PCSK9 de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en las células enteras, en un lisado celular, o pueden ser ácidos nucleicos en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aísla" o "se hace sustancialmente puro", cuando se purifica de otros componentes celulares o de otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, banda de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa, y otros bien conocidos en este campo. Véase F. Ausubel y colaboradores, Editores, 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención, por ejemplo, puede ser ADN ó ARN, y

puede contener o no secuencias intrónicas. En una modalidad, el ácido nucleico es una molécula de ADNc. El ácido nucleico puede estar presente en un vector, tal como en un vector de exhibición de fagos, o en un vector de plásmido recombinante.

5 Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener empleando técnicas de biología molecular convencionales. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, los hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que lleven genes de inmunoglobulina humana, como se describe adicionalmente más
10 adelante), los ADNcs que codifiquen las cadenas ligera y pesada del anticuerpo hecho por el hibridoma se pueden obtener mediante amplificación con reacción en cadena de la polimerasa convencional, o mediante técnicas de clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos a partir de una biblioteca de genes de inmunoglobulina
15 (por ejemplo, utilizando técnicas de exhibición de fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede recuperar a partir de diferentes clones de fagos que sean miembros de la biblioteca.

 Una vez que se obtengan los fragmentos de ADN que codifiquen los segmentos V_H y V_L , estos fragmentos de ADN se
20 pueden manipular adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinantes convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de región variable hasta los genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, hasta los genes de fragmentos Fab, o hasta un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que
25 codifique V_L ó V_H se enlaza operativamente con otra molécula de

164

ADN, o con un fragmento que codifique otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo, o un enlazador flexible. El término "operativamente enlazado", como se utiliza en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de una manera funcional, por ejemplo, de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen dentro del marco, o de tal manera que la proteína se expresa bajo el control de un promotor deseado.

El ADN aislado que codifica la región V_H se puede convertir hasta un gen de cadena pesada de longitud completa mediante el enlace operativo del ADN que codifique V_H con otra molécula de ADN que codifique regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2, y CH3). Las secuencias de los genes de región constante de cadena pesada humanos son conocidas en este campo (véase, por ejemplo, Kabat y colaboradores, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación de NIH Número 91-3242), y los fragmentos de ADN que abarquen estas regiones se pueden obtener mediante amplificación en cadena de la polimerasa convencional. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ó IgD. Para un gen de cadena pesada de un fragmento Fab, el ADN que codifique V_H se puede enlazar operativamente con otra molécula de ADN que codifique solamente la región constante CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V_L se puede convertir hasta el gen de cadena ligera de longitud completa (así como hasta un gen de cadena ligera de Fab), mediante el enlace operativo del ADN que codifique V_L con otra molécula de ADN que codifique la
5 región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de región constante de cadena ligera humanos se conocen en la materia (véase, por ejemplo, Kabat y colaboradores, 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación de
10 NIH Número 91-3242), y los fragmentos de ADN que abarquen estas regiones se pueden obtener mediante amplificación con reacción en cadena de la polimerasa convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Con el fin de crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que
15 codifican V_H y V_L se enlazan operativamente con otro fragmento que codifique un enlazador flexible, por ejemplo, que codifique la secuencia de aminoácidos $(Gly4-Ser)_3$, de tal manera que se puedan expresar las secuencias V_H y V_L como una proteína de una sola cadena contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por el enlazador
20 flexible (véase, por ejemplo, Bird y colaboradores, 1988 *Science* 242: 423-426; Huston y colaboradores, 1988 *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 85: 5879-5883; McCafferty y colaboradores, 1990 *Nature* 348: 552-554).

Generación de anticuerpos monoclonales

25 Los anticuerpos monoclonales (mAbs) se pueden producir

mediante una variedad de técnicas, incluyendo la metodología de anticuerpos monoclonales convencional, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein (1975 Nature, 256:495), o utilizando métodos de exhibición de biblioteca, tales como la exhibición de fagos.

Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema de murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas para el aislamiento de los esplenocitos inmunizados para la fusión son conocidos en este campo. También se conocen los componentes de fusión (por ejemplo, células de mieloma de murino) y los procedimientos de fusión.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal de murino preparado como se describe anteriormente. El ADN que codifique las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se puede obtener a partir del hibridoma de interés, y se puede diseñar para contener secuencias de inmunoglobulina que no sean de murino (por ejemplo, humanas), empleando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, con el objeto de crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables de murino se pueden enlazar con las regiones constantes humanas, empleando métodos conocidos en la materia (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,816,567 a Cabilly y colaboradores). Con el fin de crear un anticuerpo humanizado, las

regiones CDR de murino se pueden insertar en una estructura humana, empleando métodos conocidos en este campo. Véanse, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,225,539, y las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica
5 Números 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370.

En cierta modalidad, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Estos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PCSK9, se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que lleven partes del
10 sistema inmune humano, en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen los ratones referidos en la presente como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y son referidos colectivamente en la presente como "ratón de Ig humana".

15 El ratón HuMAb® (Medarex, Inc.) contiene mini-*loci* del gen de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y κ humanas no reconfiguradas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los *loci* de cadena μ y κ endógenos (véase, por ejemplo, Lonberg y
20 colaboradores, 1994 *Nature* 368(6474): 856-859). De conformidad con lo anterior, los ratones exhiben una expresión reducida de IgM ó κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos sufren una conmutación de clase y una mutación somática para generar la IgG κ
25 humana de alta afinidad monoclonal (Lonberg, N. y colaboradores,

1994 *supra*; revisado en Lonberg, N., 1994 *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101; Lonberg, N. y Huszar, D., 1995 *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N., 1995 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y uso de los ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas llevadas por estos ratones, se describen adicionalmente en Taylor, L. y colaboradores, 1992 *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295; Chen, J. y colaboradores, 1993 *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon y colaboradores, 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 94: 3720-3724; Choi y colaboradores, 1993 *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. y colaboradores, 1993 *EMBO J.* 12:821-830; Tuaillon y colaboradores, 1994 *J. Immunol.* 152: 2912-2920; Taylor, L. y colaboradores, 1994 *International Immunology* 579-591; y Fishwild, D. y colaboradores, 1996 *Nature Biotechnology* 14: 845-851, el contenido de todos los cuales se incorpora específicamente a la presente como referencia en su totalidad. Véanse además, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; y 5,770,429; todas a Lonberg y Kay; la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,545,807 a Surani y colaboradores; Las Publicaciones del TCP Números WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas a Lonberg y Kay; y la Publicación del TCP Número WO 01/14424 a Korman y colaboradores.

En otra modalidad, los anticuerpos humanos de la invención se

pueden reproducir utilizando un ratón que lleve secuencias de inmunoglobulina humana sobre los transgenes y los transcromosomas, tal como un ratón que lleve un transgén de cadena pesada humano y un transcromosoma de cadena ligera humano.

5 Estos ratones, referidos en la presente como "ratones KM", se describen con detalle en la Publicación Internacional Número WO 02/43478.

Todavía además, hay sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan los genes de inmunoglobulina humana disponibles en la técnica, y se pueden utilizar para reproducir los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención. Por ejemplo, se puede utilizar un sistema transgénico alternativo referido como el Xenomouse® (Abgenix, Inc.). Estos ratones se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica 10 Números 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584, y 6,162,963 a 15 Kucherlapati y colaboradores.

Más aún, hay sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana disponibles en la técnica, y se pueden utilizar para reproducir los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención. Por ejemplo, se pueden utilizar ratones que lleven tanto un transcromosoma de cadena pesada humano como un transcromosoma de cadena ligera humano, referidos como "ratones TC"; estos ratones se describen en Tomizuka y colaboradores, 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 97: 722- 20 727. Adicionalmente, se han descrito en la técnica vacas que llevan 25

transcromosomas de cadena pesada y ligera humanos (Kuroiwa y colaboradores, 2002 *Nature Biotechnology* 20: 889-894), y se pueden utilizar para reproducir los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención
5 también se pueden preparar empleando métodos de exhibición de fagos para rastrear bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Estos métodos de exhibición de fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véanse por ejemplo: Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números
10 5,223,409; 5,403,484; y 5,571,698 a Ladner y colaboradores; Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,427,908 y 5,580,717 a Dower y colaboradores; Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,969,108 y 6,172,197 a McCafferty y colaboradores; y Patentes de los Estados Unidos de
15 Norteamérica Números 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 y 6,593,081 a Griffiths y colaboradores. Las bibliotecas se pueden rastrear para determinar el enlace con la PCSK9 de longitud completa o con un epítipo particulares de PCSK9.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención
20 también se pueden preparar utilizando ratones SCID, en los cuales se han reconstituido las células inmunes humanas, de tal manera que se puede generar una respuesta a anticuerpo humano después de la inmunización. Estos ratones se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números
25 5,476,996 y 5,698,767 a Wilson y colaboradores.

Generación de anticuerpos monoclonales humanos en ratones con Ig humana

Se puede utilizar la PCSK9 humana recombinante purificada expresada en células procarióticas (por ejemplo, *E. coli*), o en
5 células eucarióticas (por ejemplo, células de mamífero, por ejemplo células HEK293) como el antígeno. La proteína se puede conjugar con un vehículo tal como hemocianina de limpete de orificio (KLH).

Los anticuerpos monoclonales completamente humanos para PCSK9 se preparan utilizando las razas HCo7, HCo12, y HCo17 de
10 ratones transgénicos HuMAb, y la raza KM de ratones transgenómicos transgénicos, cada una de las cuales expresa los genes de anticuerpo humanos. En cada una de estas razas de ratón, el gen de cadena ligera kappa de ratón endógeno se puede alterar homocigóticamente, como se describe en Chen y colaboradores,
15 1993 EMBO J. 12: 811-820, y el gen de cadena pesada de ratón endógeno se puede alterar homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 de la Publicación Internacional Número WO01109187. Cada una de estas razas de ratón lleva un transgén de cadena ligera kappa humano, KCo5, como se describe en Fishwild y colaboradores,
20 1996 *Nature Biotechnology* 14: 845-851. La raza HCo7 lleva el transgén de cadena pesada humano HCo7, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,545,806; 5,625,825; y 5,545,807. La raza HCo12 lleva el transgén de cadena pesada humano HCo12, como se describe en el Ejemplo 2
25 de la Publicación Internacional Número WO 01/09187. La raza

HC017 lleva el transgén de cadena pesada humano HCo17. La raza KNM contiene el transcromosoma SC20, como se describe en la Publicación Internacional Número WO 02/43478.

Con el objeto de generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para PCSK9, los ratones HuMAb y los ratones KM se inmunizan con la PCSK9 recombinante purificada, un fragmento de PCSK9, o un conjugado de la misma (por ejemplo, PCSK9-KLH) como antígeno. Los esquemas de inmunización generales para los ratones HuMAb se describen en Lonberg, N. y colaboradores, 1994 *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. y colaboradores, 1996 *Nature Biotechnology* 14: 845-851, y en la Publicación Internacional Número WO 98/24884. Los ratones son de 6 a 16 semanas de edad después de la primera infusión de antígeno. Se utiliza una preparación recombinante purificada (de 5 a 50 microgramos) del antígeno para inmunizar a los ratones HuMAb y a los ratones KM en la cavidad peritoneal, subcutáneamente (Sc), o mediante inyección en la pata.

Los ratones transgénicos se inmunizan dos veces con el antígeno en adyuvante completo de Freund o en adyuvante de Ribi, ya sea en la cavidad peritoneal (IP), subcutáneamente (Sc), o mediante inyección en la pata (FP), seguido por 3 a 21 días de inmunización intraperitoneal, subcutánea, o mediante inyección en la pata (hasta un total de 11 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante incompleto de Freund o Ribi. La respuesta inmune se monitorea mediante sangrados retro-orbitales. El plasma se rastrea

mediante ELISA, y se utilizan los ratones con suficientes titulaciones de inmunoglobulina humana anti-PCSK9. Los ratones se refuerzan intravenosamente con el antígeno 3 y 2 días antes del sacrificio y de la remoción del bazo. Típicamente, se llevan a cabo de 10 a 35 fusiones por cada antígeno. Se inmunizan varias docenas de ratones por cada antígeno. Se inmunizan un total de 82 ratones de las razas de ratones HCo7, HCo12, HCo17, y KM con PCSK9.

Con el fin de seleccionar los ratones HuMAb ó KM que produzcan anticuerpos que se enlacen con PCSK9, se pueden probar los sueros de los ratones inmunizados mediante ELISA, como es descrito por Fishwild, D. y colaboradores, 1996. Dicho de una manera breve, las placas de microtitulación se recubren con PCSK9 recombinante purificada a 1-2 microgramos/mililitro en suero regulado con fosfato, a 50 microgramos/pozo, incubados a 4°C durante la noche, y luego se bloquean con 200 microlitros/pozo de suero de pollo al 5 por ciento en suero regulado con fosfato/Tween (al 0.05 por ciento). Se agregan diluciones de plasma a partir de los ratones inmunizados con PCSK9 a cada pozo, y se incuban durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavan con suero regulado con fosfato/Tween, y luego se incuban con anticuerpo policlonal Fc de IgG de cabra anti-humano conjugado con peroxidasa de radícula roja (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se desarrollan con sustrato ABTS (Sigma, A-1888, 0.22 miligramos/mililitro), y se analizan mediante el espectrofotómetro a una OD de 415-495. Los esplenocitos de los

ratones que desarrollaron las titulaciones más altas de anticuerpos anti-PCSK9 son los que se utilizan para las fusiones. Se llevan a cabo las fusiones, y se prueban los sobrenadantes de hibridoma para determinar la actividad anti-PCSK9 mediante ELISA.

- 5 Los esplenocitos de ratón, aislados a partir de los ratones HuMAb y de los ratones KM, se fusionan con PEG a una línea celular de mieloma de ratón, basándose en los protocolos convencionales. Entonces se rastrean los hibridomas resultantes para determinar la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Las
- 10 suspensiones celulares individuales de los linfocitos esplénicos de los ratones inmunizados se fusionan a una cuarta parte del número de células de mieloma de ratón no secretoras de SP2/0 (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50 por ciento (Sigma). Las células se aplican a aproximadamente 1×10^5 /pozo en placas de microtitulación de fondo
- 15 plano, seguido por aproximadamente dos semanas de incubación en un medio selectivo conteniendo suero bovino fetal al 10 por ciento, medio acondicionado P388D 1 al 10 por ciento (ATCC, CRL TIB-63), Origen® al 3-5 por ciento (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con alta glucosa, L-glutamina, y piruvato de sodio), más HEPES 5
- 20 mM, 2-mercaptoetanol 0.055 mM, 50 microgramos/mililitro de gentamicina, y 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Después de una a dos semanas, las células se cultivan en el medio en donde se reemplaza el HAT con HT. Luego se rastrean los pozos individuales mediante ELISA para determinar los anticuerpos IgG monoclonales anti-PCSK9
- 25 humanos. Una vez que se presenta un crecimiento de hibridoma

extenso, se monitorea el medio usualmente después de 10 a 14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpo se vuelven a aplicar en la placa, se rastrean nuevamente, y si todavía son positivos para la IgG humana, se subclonan los anticuerpos monoclonales anti-PCSK9 cuando menos dos veces mediante dilución limitante. Entonces se cultivan los subclones estables *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en un medio de cultivo de tejido para la caracterización adicional.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos

monoclonales humanos

Con el objeto de hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales humanos de la invención, se pueden aislar los esplenocitos y/o las células de nodos linfáticos de los ratones inmunizados, y se pueden fusionar con una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden rastrear para determinar la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Por ejemplo, se pueden fusionar suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de los ratones inmunizados con una sexta parte del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50 por ciento. Las células se aplican a aproximadamente 2 x 145 en placas de microtitulación de fondo plano, seguido por una incubación de dos semanas en un medio selectivo conteniendo suero de clon fetal al 20 por ciento, medio acondicionado "653" al 18 por ciento, Origen® al 5 por ciento

(IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercapto-etanol 0.055 mM, 50 unidades/mililitro de penicilina, 50 miligramos/mililitro de estreptomycin, 50 microgramos/mililitro de gentamicina, y 1X HAT (Sigma; el HAT se agrega 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células se pueden cultivar en el medio en donde el HAT es reemplazado con HT. Luego los pozos individuales se pueden rastrear mediante ELISA para determinar los anticuerpos IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez que se presenta un crecimiento de hibridoma extenso, se puede observar el medio usualmente después de 10 a 14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos se pueden volver a aplicar en placas, se rastrean nuevamente, y si todavía son positivos para la IgG humana, los anticuerpos monoclonales se pueden subclonar cuando menos dos veces mediante dilución limitante. Luego los subclones estables se pueden cultivar *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en un medio de cultivo de tejido para la caracterización.

Con el fin de purificar los anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados se pueden cultivar en matraces centrífugos de dos litros para la purificación del anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía por afinidad con la proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, N. J.). La IgG eluida se puede verificar mediante electroforesis en gel y mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento, para asegurar la pureza. La solución reguladora

se puede intercambiar en suero regulado con fosfato, y se puede determinar la concentración mediante la OD_{280} , utilizando un coeficiente de extinción de 1.43. Los anticuerpos monoclonales se pueden poner en alícuotas y se almacenan a -80°C .

5 **Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales**

Los anticuerpos de la invención también se pueden producir en un transfectoma de célula huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de
10 transfección genética, como es bien conocido en este campo (por ejemplo, Morrison, 1985 Science 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o los fragmentos de anticuerpos de los mismos, se pueden obtener ADNs que codifiquen las cadenas ligera y pesada parciales o de longitud
15 completa mediante técnicas de biología molecular convencionales (por ejemplo, amplificación con reacción en cadena de la polimerasa o clonación de ADNc utilizando un hibridoma que exprese el anticuerpo de interés), y los ADNs se pueden insertar en vectores de expresión, de tal manera que los genes se enlacen operativamente
20 con las secuencias de control de transcripción y de traducción. En este contexto, el término "operativamente enlazado" pretende significar que se liga un gen de anticuerpo en un vector, de tal manera que las secuencias de control de transcripción y de traducción dentro del vector sirven para su función pretendida de
25 regular la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El

vector de expresión y las secuencias de control de expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en un vector separado, o más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante los métodos convencionales (por ejemplo, ligamiento de los sitios de restricción complementarios sobre el fragmento del gen de anticuerpo y el vector, o ligamiento de extremos romos si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en la presente se pueden utilizar para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo, mediante su inserción en vectores de expresión que ya codifiquen las regiones constante de cadena pesada y constante de cadena ligera del isotipo deseado, de tal manera que el segmento V_H se enlace operativamente con los segmentos CH dentro del vector, y el segmento V_L se enlace operativamente con el segmento CL dentro del vector. Adicionalmente o de una manera alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula huésped. El gen de la cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector, de tal manera que el péptido de señal se enlace dentro del marco con el término amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o

un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal a partir de una proteína que no sea inmunoglobulina).

En adición a los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores, y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Estas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. 1990 Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se vaya a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras para la expresión de células huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados a partir de citomegalovirus (CMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío mayor de adenovirus (AdMLP)), y poliovirus. De una manera alternativa, se pueden utilizar secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de p-globina. Todavía adicionalmente, los elementos

147

reguladores compuestos de secuencias a partir de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SRa, que contiene secuencias a partir del promotor temprano de SV40, y la repetición terminal larga del virus de leucemia de células-T humano tipo 1
5 (Takebe y colaboradores, 1988 *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

En adición a los genes de cadena de anticuerpo y a las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulen la réplica del vector en las células huésped
10 (por ejemplo, orígenes de réplica), y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en donde se haya introducido el vector (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 4,399,216; 4,634,665; y 5,179,017, todas de
15 Axel y colaboradores). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina, o metotrexato, en una célula huésped en la que se haya introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables incluyen el gen de reductasa de dihidrofolato (DHFR) (para utilizarse en
20 células huésped-dhfr con selección/amplificación de metotrexato), y el gen neo (para la selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, los vectores de expresión que codifiquen las cadenas pesada y ligera se transfectan a una célula huésped mediante técnicas convencionales.
25 Las diferentes formas del término "transfección" pretenden abarcar

una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariótica o eucariótica, por ejemplo electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección de DEAE-dextrano, y similares. Teóricamente, es posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procarióticas o eucarióticas. La expresión de anticuerpos en células eucarióticas, en particular en células huésped de mamífero, se discute debido a que estas células eucarióticas, y en particular las células de mamífero, tienen más probabilidades que las células procarióticas de ensamblarse y secretar un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo. La expresión procariótica de los genes de anticuerpo se ha reportado como inefectiva para la producción de altos rendimientos de anticuerpos activos (Boss y Wood, 1985 *Immunology Today* 6:12-13).

Las células huésped de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen las células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo las células CHO-DHFR, descritas en Urlaub y Chasin, 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 77: 4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo como se describe en Kaufman y Sharp, 1982 *Mol. Biol.* 159: 601-621, células de mieloma NSO, células COS, y células SP2. En particular, para utilizarse con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión es el sistema de expresión del gen GS mostrado en las Patentes Números WO 87/04462, WO 89/01036, y EP 338,841. Cuando se introducen vectores de expresión

recombinante que codifican genes de anticuerpo en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen mediante el cultivo de las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped, o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en donde se cultiven las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar a partir del medio de cultivo empleando métodos de purificación de proteína convencionales.

Moléculas biespecíficas

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas biespecíficas que comprenden una molécula de enlace de PCSK9 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PCSK9, o un fragmento del mismo), de la invención. Una molécula de enlace de PCSK9 de la invención se puede derivar o enlazar con otra molécula funcional, por ejemplo
15 otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor), para generar una molécula biespecífica que se enlace con cuando menos dos sitios de enlace diferentes o moléculas objetivo. La molécula de enlace de PCSK9 de la invención de hecho se puede derivar o enlazar con más de una molécula funcional
20 adicional, para generar moléculas multiespecíficas que se enlacen con más de dos sitios de enlace y/o moléculas objetivo; estas moléculas multiespecíficas también pretenden ser abarcadas por el término "molécula biespecífica", como se utiliza en la presente. Con el objeto de crear una molécula biespecífica de la invención, un
25 anticuerpo de la invención se puede enlazar funcionalmente (por

10/6

ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente, o de otra manera) con una o más moléculas de enlace diferentes, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de enlace, de tal manera que resulte una

5 molécula biespecífica.

De conformidad con lo anterior, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden cuando menos una primera especificidad de enlace para PCSK9, y una segunda especificidad de enlace para un segundo epítipo objetivo.

10 En una modalidad, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden, como una especificidad de enlace, cuando menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o Fv de una sola cadena. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o de

15 cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo, tal como un Fv o una construcción de una sola cadena, como se describe en Ladner y colaboradores, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,946,778, el contenido de la cual se incorpora expresamente como referencia.

20 Las moléculas biespecíficas de la presente invención se pueden preparar mediante la conjugación de las especificidades de enlace constituyentes, empleando métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, cada especificidad de enlace de la molécula biespecífica se puede generar por separado, y luego se conjuga con

25 otra. Cuando las especificidades de enlace son proteínas o péptidos,

se pueden utilizar una variedad de agentes de acoplamiento o de reticulación para la conjugación covalente. Los ejemplos de los agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodi-imida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitro-benzoico) (DTNB), o-fenilen-dimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-ditiopiridil)-propionato (SPDP), y 4-(N-maleimido-metil)ciclohexan-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky y colaboradores, 1984 *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu y colaboradores, 1985 *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 82:8648). Otros métodos incluyen aquéllos descritos en Paulus, 1985 *Behring Ins. Mitt.* No. 78,118-132; Brennan y colaboradores, 1985 *Science* 229:81-83), y Glennie y colaboradores, 1987 *J. Immunol.* 139:2367-2375. Los agentes de conjugación son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

15 Cuando las especificidades de enlace son anticuerpos, se pueden conjugar mediante el enlace con sulfhidrilo de las regiones de articulación del término-C de las dos cadenas pesadas. En una modalidad particular, la región de articulación se modifica para contener un número no de residuos de sulfhidrilo, por ejemplo uno, antes de la conjugación.

20 De una manera alternativa, ambas especificidades de enlace se pueden codificar en el mismo vector, y se pueden expresar y ensamblar en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión de mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂, o ligando x Fab.

198

Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de una sola cadena que comprenda un anticuerpo de una sola cadena y un determinante de enlace, o una molécula biespecífica de una sola cadena que comprenda dos determinantes de enlace. Las moléculas biespecíficas pueden comprender cuando menos dos moléculas de una sola cadena. Los métodos para la preparación de las moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,260,203; 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498; y 5,482,858.

El enlace de las moléculas biespecíficas con sus objetivos biespecíficos se puede confirmar, por ejemplo, mediante el ensayo inmunosorbente enlazado con enzima (ELISA), radioinmunoensayo (REA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o ensayo Western blot. Cada uno de estos ensayos detecta en general la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de interés particular, mediante el empleo de un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

Ensayos funcionales

Las características funcionales de las moléculas de enlace de PCSK9 se pueden probar *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, las moléculas de enlace se pueden probar para determinar su capacidad para inhibir la interacción de PCSK9 con LDL-R, para inhibir los efectos sobre LDL-R dependientes de PCSK9 (por ejemplo, la absorción de LDL-c mediada por LDL-R), para inhibir la actividad

proteolítica de PCSK9, y para disminuir LDL-c *in vivo*.

El enlace de PCSK9 con LDL-R se puede detectar utilizando Biacore® mediante la inmovilización de LDL-R en un soporte sólido, y la detección del enlace de PCSK9 soluble con el LDL-R. De una
5 manera alternativa, la PCSK9 se puede inmovilizar, y se puede detectar el enlace de LDL-R. También se puede analizar el enlace de PCSK-9/LDL-R mediante ELISA (por ejemplo, mediante la detección del enlace de PCSK9 con el LDL-R inmovilizado), o mediante transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Con
10 el fin de llevar a cabo la FRET, se puede detectar el enlace de PCSK9 marcada con fluoróforo, con LDL-R en solución (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,631,169).

El enlace de PCSK9 con LDL-R se ha detectado mediante co-
15 inmunoprecipitación (Lagace y colaboradores, 2006 J. Clin. Inv. 116(11):2995-3005). Con el fin de examinar el enlace de PCSK9-LDL-R de esta manera, se cultivan células HepG2 en un medio agotado en esterol durante 18 horas. La PCSK9 purificada se agrega al medio en la presencia de cloroquina 0.1 mM, y las células se
20 incuban durante una hora. Las células se lisan en un detergente suave (digitonina al 1 por ciento en peso/volumen). La PCSK9 o el LDL-R se inmunoprecipita a partir de los lisados celulares, se separa mediante SDS-PAGE, y se inmunomancha para detectar la presencia del LDL-R o la PCSK9 co-inmunoprecipitados, respectivamente
25 (Lagace y colaboradores, 2006 J. Clin. Inv. 116(11): 2995-3005).

Estos ensayos se pueden conducir con una forma mutante de PCSK9 que se enlaza con LDL-R con una avidez más alta (por ejemplo, hPCSK9 D374Y) (Lagace y colaboradores, 2006, *supra*).

Los hepatocitos expresan LDL-R sobre su superficie celular. La
5 adición de PCSK9 purificada a las células de hepatocitos cultivadas (por ejemplo, células HepG2, ATCC, HB-8065), produce una disminución en la expresión de LDL-R de una manera dependiente de la dosis y del tiempo (Lagace y colaboradores, 2006 J. Clin. Inv. 116(11): 2995-3005). Las moléculas de enlace de PCSK9 se pueden
10 probar para determinar su capacidad para aumentar los niveles de LDL-R mediante los hepatocitos. Por ejemplo, las células HepG2 se cultivan en un medio agotado en esterol (DMEM complementado con 100 Unidades/mililitro de penicilina, 100 microgramos/mililitro de sulfato de estreptomicina, y 1 gramo/litro de glucosa, suero
15 deficiente en lipoproteína de becerro recién nacido al 5 por ciento (volumen/volumen) (NCLPDS), compactina de sodio 10 μ M, y mevalonato de sodio 50 μ M) durante 18 horas, para inducir la expresión de LDL-R. Se agrega la PCSK9 purificada (5 microgramos/mililitro) al medio. Se determinan los niveles de LDL-R en las células
20 cosechadas a las 0, 0.5, 1, 2, y 4 horas después de la adición de la PCSK9 (Lagace y colaboradores, 2006 J. Clin. Inv. 116(11): 2995-3005). Los niveles de LDL-R se pueden determinar mediante citometría de flujo, FRET, inmunomanchado, u otros medios.

La absorción de LDL-c por parte de las células (por ejemplo,
25 las células HepG2) se puede medir utilizando LDL-c

fluorescentemente marcado, dil-LDL (3,3'-dioctadecil-indocarbocianina-lipoproteína de baja densidad) como es descrito por Stephan y Yurachek (1993 J. Lipid Res. 34:325-330). Dicho de una manera breve, las células se incuban en un cultivo con dil-LDL
5 (de 20 a 100 microgramos de proteína/mililitro) a 37°C durante 2 horas. Las células se lavan, se lisan, y se cuantifica la concentración de Dil-LDL internalizado utilizando un espectrofluorómetro. Se puede medir la absorción de LDL-c en las células que hagan contacto con un agente de enlace de PCSK9 (antes de, y/o durante, el período en
10 el cual esté presente Dil-LDL en el cultivo celular).

La actividad proteolítica de PCSK9 se puede medir *in vitro* utilizando sustratos peptídicos sintéticos. Véase, por ejemplo, Seidah y colaboradores, 2003 *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 100(3): 928-933. En un método de ejemplo, la PCSK9 purificada se incubaba a 37°C
15 durante 3 a 18 horas con Suc-RPFHLLVY-MCA 50 µM (4-metil-cumarin-7-amida) en Tris 25 mM/Mes, pH de 7.4 + CaCl₂ 2.5 mM y SDS al 0.5 por ciento. Se utiliza el análisis de fluorescencia y de tiempo de vuelo con ionización de desorción de láser asistida por matriz (Seidah y colaboradores, 2003 *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*,
20 100(3): 928-933; Basak y colaboradores, 2002 *FEBS Lett.* 514: 333-339). Este ensayo se puede utilizar para detectar las diferencias en la eficiencia de disociación en la presencia de moléculas de enlace de PCSK9.

Los ratones transgénicos que sobre-expresan la PCSK9
25 humana en el hígado, tienen mayores niveles de LDL-c en plasma en

702

relación con los ratones no transgénicos (Lagace y colaboradores, 2006 J. Clin. Inv. 116(11): 2995-3005). Véase también Maxwell y Breslow, 2004 *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 101: 7100, que describe la sobre-expresión de PCSK9 utilizando un vector de adenovirus en ratones. Se han producido ratones PCSK9^{-/-} (Rashid y colaboradores, 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102(5): 5374-5379). Estos ratones se pueden modificar genéticamente para expresar un transgén de hPCSK9. Las moléculas de enlace de PCSK9 se pueden probar en cualquiera de estos modelos, o en animales que no estén genéticamente modificados, para determinar su capacidad para eliminar o reducir el colesterol total y/o el LDL-c.

La cinética de la eliminación de LDL del plasma se puede determinar inyectando a los animales con LDL marcado con [¹²⁵I], obteniendo muestras de sangre a los 0, 5, 10, 15, y 30 minutos después de la inyección, y cuantificando [¹²⁵I]-LDL en las muestras (Rashid y colaboradores, 2005 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102(5): 5374-5379). Se aumenta el índice de eliminación de LDL en los ratones PCSK9^{-/-} en relación ratones de tipo silvestre (Rashid y colaboradores, 2005 *supra*). La mayor eliminación de LDL en los animales a los que se administró una molécula de enlace de PCSK9 indica que el agente inhibe la actividad de PCSK9 *in vivo*.

Las disminuciones en el colesterol total en plasma, los triglicéridos en plasma, o LDL-c en respuesta al tratamiento con una molécula de enlace de PCSK9, indican la eficacia terapéutica de la molécula de enlace de PCSK9. Los perfiles de colesterol y lípido se

pueden determinar por medios colorimétricos, cromatográficos de gases-líquidos, o enzimáticos, utilizando los kits comercialmente disponibles.

Composiciones farmacéuticas

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, la cual contiene una o una combinación de moléculas de enlace de PCSK9 (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, o porciones de enlace de antígeno de los mismos), de la presente invención, formuladas junto
10 con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden incluir una o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) moléculas de enlace. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos o agentes que se enlacen con epítomos diferentes sobre
15 el antígeno objetivo, o que tengan actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en una terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-PCSK9, combinado con
20 cuando menos otro agente reductor del colesterol. Los ejemplos de los agentes terapéuticos que se pueden utilizar en la terapia de combinación se describen con mayor detalle más adelante, en la sección sobre los usos de los agentes de la invención.

Como se utiliza en la presente, "vehículo farmacéuticamente
25 aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de

dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. El vehículo debe ser adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal, o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo se puede recubrir en un material para proteger al compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

10 Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto progenitor, y no imparte ningún efecto toxicológico indeseado (véase, por ejemplo, Berge, S. M. y colaboradores, 1977 *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19). Los ejemplos de 15 estas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen aquéllas derivadas a partir de los ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso, y similares, así como a partir de los ácidos orgánicos no 20 tóxicos, tales como los ácidos mono- y di-carboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos sustituidos por fenilo, hidroxí-ácidos alcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Las sales de adición de base incluyen aquéllas derivadas 25 a partir de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio,

no

magnesio, calcio, y similares, así como a partir de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibencil-etilen-diamina, N-metil-glucamina, cloro-procaína, colina, dietanolamina, etilen-diamina, procaína, y similares.

5 Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de los antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, 10 sulfito de sodio, y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxí-anisól butilado (BHA), hidroxí-tolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilen-diamina-tetra-acético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, 15 ácido fosfórico, y similares.

Los ejemplos de los vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas 20 adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las 25 dispersiones, y mediante el uso de tensoactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservadores, agentes humectantes, agentes emulsionantes, y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, cloro-butanol, ácido sórbico de fenol, y similares. También puede ser recomendable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares, en las composiciones. En adición, se puede provocar una absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retarden la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de este medio y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la materia. Excepto hasta donde sea cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y

almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un solvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión, o mediante el uso de tensoactivos. En muchos casos, se pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Se puede provocar una absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado, con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguida por esterilización por microfiltración. En términos generales, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la

preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización), lo cual proporciona un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución
5 previamente filtrada estéril del mismo.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una sola forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se esté tratando, y del modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que se
10 puede combinar con un material de vehículo para producir una sola forma de dosificación en general será la cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. En general, del cien por ciento, esta cantidad estará en el intervalo de aproximadamente el 0.01 por ciento a aproximadamente el 99 por ciento de ingrediente activo, de
15 aproximadamente el 0.1 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, o de aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el 30 por ciento de ingrediente activo, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la
20 respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a través del tiempo, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente, como sea indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente
25 conveniente formular las composiciones parenterales en una forma

unitaria de dosificación para mayor facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación, como se utiliza en la presente, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos

5 que se vayan a tratar; cada unidad contiene una cantidad previamente determinada del compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención es dictada por, y depende

10 directamente de, las características únicas del compuesto activo, y del efecto terapéutico particular que se vaya a lograr, y de las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de este compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en los individuos.

15 Para la administración del anticuerpo, la dosificación está en el intervalo de aproximadamente 0.0001 a 100 miligramos/kilogramo, y más usualmente de 0.01 a 5 miligramos/kilogramo del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 0.3 miligramos/kilogramo de peso corporal, 1 miligramo/kilogramo de

20 peso corporal, 3 miligramos/kilogramo de peso corporal, 5 miligramos/kilogramo de peso corporal, o 10 miligramos/kilogramo de peso corporal, o dentro del intervalo de 1 a 10 miligramos/kilogramo. Un régimen de tratamiento de ejemplo implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres

25 semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez

710

cada 3 meses, o una vez cada 3 a 6 meses. Los regímenes de dosificación para la molécula de enlace de PCSK9 de la invención incluyen 1 miligramo/kilogramo de peso corporal o 3 miligramos/kilogramo de peso corporal mediante administración intravenosa, dándose el anticuerpo empleando uno de los siguientes programas de dosificación: cada cuatro semanas para seis dosificaciones, luego cada tres meses; cada tres semanas; 3 miligramos/kilogramo de peso corporal una vez, seguidos por 1 miligramo/kilogramo de peso corporal cada tres semanas.

10 En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más moléculas de enlace (por ejemplo, anticuerpos monoclonales), con diferentes especificidades de enlace, en cuyo caso, la dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. La molécula de enlace de PCSK9 normalmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosificaciones individuales pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, trimestrales, o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica mediante la medición de los niveles en sangre de la molécula de enlace de PCSK9 en el paciente. En 15 algunos métodos, la dosificación se ajusta para alcanzar una concentración en plasma de la molécula de enlace de PCSK9 de aproximadamente 1 a 1,000 microgramos/mililitro, y en algunos métodos, de aproximadamente 25 a 300 microgramos/mililitro.

25 De una manera alternativa, la molécula de enlace de PCSK9 se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en

11

cuyo caso, se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la vida media de la molécula de enlace de PCSK9 en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguidos por los anticuerpos humanizados, los anticuerpos "humaneered", los anticuerpos quiméricos, y los anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento durante el resto de sus vidas. En las aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos, hasta que se reduzca o se termine el progreso de la enfermedad, o hasta que el paciente muestra una disminución parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo de administración particular, sin que sea tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, incluyendo

22

la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, la sal, o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, el índice de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general, y la historia médica previa del paciente que se esté tratando, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

10 Una "dosificación terapéuticamente efectiva" de la molécula de enlace de PCSK9 de la invención puede dar como resultado una disminución en la severidad de los síntomas de la enfermedad (por ejemplo, una disminución en el colesterol en plasma, o una disminución en un síntoma de un trastorno relacionado con el

15 colesterol), un aumento en la frecuencia y duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debido a la aflicción de la enfermedad.

Una composición de la presente invención se puede administrar por una o más vías de administración, empleando uno o más de una

20 variedad de métodos conocidos en este campo. Como será apreciado por el experto, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración para las moléculas de enlace de PCSK9 de la invención incluyen administración intravenosa, intramuscular, intradérmica,

25 intraperitoneal, subcutánea, espinal, u otras vías de administración

parenterales, por ejemplo mediante inyección o infusión. La frase "administración parenteral", como se utiliza en la presente, significa los modos de administración diferentes de la administración enteral y tópica, usualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural, e intraesternal.

10 De una manera alternativa, la molécula de enlace de PCSK9 de la invención se puede administrar por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica, o mucosa, por ejemplo intranasalmente, oralmente, vaginalmente, rectalmente, sublingualmente, o tópicamente.

15 Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán al compuesto contra la liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biocompatibles y biodegradables, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poli-glicólico, 20 colágeno, poli-orto-ésteres, y ácido poli-láctico. Muchos métodos para la preparación de estas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, 25 J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

24

las composiciones terapéuticas se pueden administrar con los dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una modalidad, una composición terapéutica de la invención se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmico sin aguja, tal como los dispositivos mostrados en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 o 4,596,556. Los ejemplos de los implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,487,603, la cual muestra una bomba de micro-infusión implantable para dosificar medicamento a una velocidad controlada; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,486,194, la cual muestra un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,447,233, la cual muestra una bomba para infusión de medicamento para suministrar medicamento a una velocidad de infusión precisa; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,447,224, la cual muestra un aparato para infusión implantable de flujo variable para suministro continuo del fármaco; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,439,196, la cual muestra un sistema de suministro de fármaco osmótico que tiene compartimientos de múltiples cámaras; y Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,475,196, la cual muestra un sistema de suministro de fármaco osmótico. Estas patentes se incorporan a la presente como referencia. Muchos otros de estos

210

implantes, sistemas de suministro, y módulos, son conocidos por los expertos en la materia.

En ciertas modalidades, las moléculas de enlace de PCSK9 de la invención se pueden formular para asegurar una distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hemato-encefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Con el objeto de asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la barrera hemato-encefálica (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más fracciones, las cuales se transportan selectivamente hacia las células u órganos específicos, y de esta manera mejoran el suministro del fármaco dirigido (véase, por ejemplo, V.V. Ranade, 1989 J. Cline Pharmacol. 29:685). Las fracciones de dirección de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,416,016 a Low y colaboradores); manosidas (Umezawa y colaboradores, 1988 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); anticuerpos (P.G. Bloeman y colaboradores, 1995 *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais y colaboradores, 1995 *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); receptor de proteína A de tensoactivo (Briscoe y colaboradores, 1995 *Am. J. Physiol.* 1233: 134); página 120 (Schreier y colaboradores, 1994 *J. Biol. Chem.* 269: 9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen, 1994 *FEBS Lett.* 346: 123;

J.J. Killian; I.J. Fidler, 1994 *Immunomethods* 4: 273.

Usos y métodos de la invención

Las moléculas de enlace de PCSK9 descritas en la presente tienen utilidades de diagnóstico y terapéuticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a las células en cultivo, por ejemplo *in vitro* o *in vivo*, o en un sujeto, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir, o diagnosticar una variedad de trastornos. Las moléculas de enlace de PCSK9 son particularmente adecuadas para el tratamiento de pacientes humanos que tengan, o que estén en riesgo de tener, colesterol elevado o una condición asociada con colesterol elevado, por ejemplo, un trastorno de lípidos (por ejemplo, hiperlipidemia, hiperlipidemia tipo I, tipo II, tipo III, tipo IV, o tipo V, hipertrigliceridemia secundaria, hipercolesterolemia, xantomatosis, deficiencia de acetil-transferasa de colesterol). Las moléculas de enlace de PCSK9 también son adecuadas para el tratamiento de pacientes humanos que tengan condiciones arterioescleróticas (por ejemplo, aterosclerosis), enfermedad de arteria coronaria, enfermedad cardiovascular, y los pacientes en riesgo de tener estos trastornos, por ejemplo, debido a la presencia de uno o más factores de riesgo (por ejemplo, hipertensión, fumar cigarrillos, diabetes, obesidad, o hiperhomocisteinemia).

Cuando las moléculas de enlace de PCSK9 se administran junto con otro agente, los dos se pueden administrar en secuencia en cualquier orden, o de una manera simultánea. En algunas modalidades, una molécula de enlace de PCSK9 se administra a un

sujeto que también esté recibiendo terapia con un segundo agente (por ejemplo, un segundo agente reductor de colesterol). Los agentes reductores de colesterol incluyen estatinas, secuestrantes de ácido biliar, niacina, derivados de ácido fibríco, y ácidos omego-dicarboxílicos de cadena alfa larga. Las estatinas inhiben la síntesis del colesterol mediante el bloqueo de la HMG-CoA, una enzima clave en la biosíntesis de colesterol. Los ejemplos de las estatinas son lovastatina, pravastatina, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, y simvastatina. Los secuestrantes de ácido biliar interrumpen el reciclo de los ácidos biliares desde el intestino hasta el hígado. Los ejemplos de estos agentes son colestiramina y clorhidrato de colestipol. Los ejemplos de los derivados de ácido fibríco son clofibrato y gemfibrozil. Los ácidos omego-dicarboxílicos de cadena alfa larga son descritos, por ejemplo, por Bisgaier y colaboradores, 1998, J. Lipid Res. 39: 17-30; Publicación Internacional Número WO 98/30530; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,689,344; Publicación Internacional Número WO 99/00116; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,756,344; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 3,773,946; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,689,344; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,689,344; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,689,344; y Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 3,930,024); éteres (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,711,896; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica

Número 5,756,544; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,506,799). Los fosfatos de dolicol (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,613,593), y los derivados de azolidinadiona (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica
5 Número 4,287,200) también se pueden utilizar para reducir los niveles de colesterol.

Un régimen de terapia de combinación puede ser aditivo, o puede producir resultados sinérgicos (por ejemplo, reducciones en el colesterol mayores que las esperadas por el uso combinado de los
10 dos agentes). En algunas modalidades, la terapia de combinación con una molécula de enlace de PCSK9 y una estatina produce resultados sinérgicos (por ejemplo, reducciones sinérgicas en el colesterol). En algunos sujetos, esto puede permitir la reducción de la dosificación de estatina para alcanzar los niveles de colesterol
15 deseados.

Las moléculas de enlace de PCSK9 son útiles para los sujetos que sean intolerantes a la terapia con otro agente reductor de colesterol o para quienes la terapia con otro agente reductor de colesterol haya producido resultados inadecuados (por ejemplo, los
20 sujetos que experimenten una reducción insuficiente de LDL-c con la terapia con estatina).

Una molécula de enlace de PCSK9 descrita en la presente se puede administrar a un sujeto con colesterol elevado (por ejemplo, un sujeto humano con niveles de colesterol totales en plasma de 200
25 miligramos/decilitro o mayores, un sujeto humano con niveles de

LDL-c de 160 miligramos/decilitro o mayores).

En una modalidad, las moléculas de enlace de la invención se pueden utilizar para detectar los niveles de PCSK9. Esto se puede lograr, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra (tal como una muestra *in vitro*) y una muestra de control, con la molécula de enlace de PCSK9, bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre la molécula de enlace y PCSK9. Cualesquiera complejos formados entre la molécula y PCSK9 se detectan y se comparan en la muestra y en el control. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo métodos de detección convencionales, bien conocidos en la técnica, tales como ELISA y ensayos citométricos de flujo, utilizando las composiciones de la invención.

De conformidad con lo anterior, en un aspecto, la invención proporciona además métodos para detectar la presencia de PCSK9 (por ejemplo, hPCSK9) en una muestra, o para medir la cantidad de PCSK9, los cuales comprenden poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con una molécula de enlace de PCSK9 (por ejemplo, un anticuerpo) de la invención, bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o la porción del mismo y la PCSK9. Entonces se detecta la formación de un complejo, en donde una diferencia en la formación del complejo entre la muestra comparada con la muestra de control, indica la presencia de PCSK9 en la muestra.

También, dentro del alcance de la invención están los kits que consisten en las composiciones de la invención, e instrucciones para

200

utilizarlos. El kit puede contener además cuando menos un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tenga una actividad complementaria que se enlace con un epítopo sobre el antígeno objetivo distinto del primer anticuerpo). Los kits típicamente incluyen una etiqueta que indica el uso pretendido del contenido del kit. El término "etiqueta" incluye cualquier escrito o material registrado suministrado sobre o con el kit, o que acompañe de otra manera al kit.

Habiéndose descrito completamente la invención, se ilustra además mediante los siguientes ejemplos y reivindicaciones, los cuales son ilustrativos y no pretenden ser adicionalmente limitantes. Los expertos en la materia reconocerán o podrán aseverar, empleando no más que experimentación de rutina, numerosos equivalentes para los procedimientos específicos descritos en la presente. Estos equivalentes están dentro del alcance de la presente invención y de las reivindicaciones. El contenido de todas las referencias, incluyendo las patentes expedidas y las solicitudes de patente publicadas, citadas a través de toda esta solicitud, se incorpora a la presente como referencia.

20

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos humanos mediante exhibición de fagos.

Para la generación de anticuerpos contra hPCSK9, se llevan a cabo selecciones con la biblioteca de exhibición de fagos MorphoSys HuCAL GOLD®. La HuCAL GOLD es una biblioteca de Fab basada

25

201

en el concepto de HuCAL en donde se diversifican las seis CDRs, y que emplea la tecnología CYSDISPLAY para enlazar los fragmentos Fab con la superficie del fago (Knappik y colaboradores, 2000 *J. Mol. Biol.* 296: 57-86; Krebs y colaboradores, 2001 *J. Immunol. Methods* 254: 67-84; Rauchenberger y colaboradores, 2003 *J. Biol. Chem.* 278(40): 38194-38205; Publicación Internacional Número WO 01/05950, Löhning, 2001).

Rescate del fagémido, amplificación del fago, y purificación

La biblioteca HuCAL GOLD se amplifica en un medio 2xYT
10 conteniendo 34 microgramos/mililitro de cloranfenicol y glucosa al 1 por ciento (2xYT-CG). Después de la infección con los fagos auxiliares de hiper-fagos a una OD_{600nm} de 0.5 (30 minutos a 37°C sin agitación; 30 minutos a 37°C agitando a 250 revoluciones por minuto), las células se centrifugan (4,120 g; 5 minutos; 4°C), se
15 vuelven a suspender en 2xYT/34 microgramos/mililitro de cloranfenicol/50 microgramos/mililitro de canamicina/IPTG 0.25 mM, y se cultivan durante la noche a 22°C. Los fagos se precipitan en PEG dos veces a partir del sobrenadante, se vuelven a suspender en suero regulado con fosfato/glicerol al 20 por ciento, y se almacenan
20 a -80°C.

La amplificación del fago entre dos rondas de extensión se conduce como sigue: Las células TG1 de *E. coli* en fase mid-log se infectan con los fagos eluidos, y se aplican sobre LB-ágar complementado con el 1 por ciento de glucosa, y 34
25 microgramos/mililitro de cloranfenicol (placas de LB-CG). Después

m

de la incubación durante la noche a 30°C, las colonias de TG1 se raspan de las placas de ágar, y se utilizan para inocular 2xYT-CG hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.5, y se agregan los fagos auxiliares de híper-fagos para la infección como se describe anteriormente.

5 ***Extensiones con HuCAL GOLD***

Para la selección de los anticuerpos que reconocen la hPCSK9, se aplicaron dos estrategias de extensión diferentes. En resumen, los fagos HuCAL-GOLD-anticuerpos se dividen en cuatro grupos que comprenden diferentes combinaciones de genes maestros VH (grupo 1: VH1/5 λ k, grupo 3: VH2/4/6 λ k, grupo 4: VH1-6 λ k). Estos grupos se someten individualmente a tres rondas de extensión en fase sólida sobre la hPCSK9 humana directamente recubierta en placas Maxisorp, y en adición tres rondas de extensión en solución sobre la hPCSK9 biotinilada.

La primera variante de extensión es la extensión en fase sólida contra hPCSK9: dos pozos de una placa Maxisorp (F96 Nunc-Immunoplate) se recubren con 300 microlitros de 5 microgramos/mililitro de hPCSK9 - cada una durante la noche a 4°C. Los pozos recubiertos se lavan dos veces con 350 microlitros de suero regulado con fosfato, y se bloquean con 350 microlitros de MPBS al 5 por ciento durante 2 horas a temperatura ambiente sobre un agitador de placas de microtitulación. Para cada extensión, se bloquean aproximadamente 10³ fagos HuCAL GOLD-anticuerpos con un volumen igual de PBST/MP al 5 por ciento durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pozos recubiertos se lavan dos veces con

293

350 microlitros de suero regulado con fosfato después del bloqueo. Se agregan 300 microlitros de fago HuCAL GOLD®-anticuerpos previamente bloqueados a cada pozo recubierto, y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente sobre un agitador. El lavado se lleva a cabo mediante la adición de cinco veces 350 microlitros de suero regulado con fosfato/Tween al 0.05 por ciento, seguidas por lavado otras cuatro veces con suero regulado con fosfato. La elución del fago a partir de la placa se lleva a cabo con 300 microlitros de DTT 20 mM en Tris/HCl 10 mM, pH de 8, por pozo, durante 10 minutos. El eluato del fago de DTT se agrega a 14 mililitros de TG1 de *E. coli*, el cual se cultiva hasta una OD₆₀₀ de 0.6 a 0.8 a 37°C en un medio 2xYT, y se incuba en tubos de plástico de 50 mililitros durante 45 minutos a 37°C sin agitación para la infección del fago. Después de la centrifugación durante 10 minutos a 5,000 revoluciones por minuto, los gránulos bacterianos se vuelven a suspender cada uno en 50 microlitros del medio 2xYT, se aplican a las placas de ágar 2xYT-CG, y se incuban durante la noche a 30°C. Entonces se raspan las colonias de las placas, y se rescatan los fagos y se amplifican como se describe anteriormente. Las segunda y tercera rondas de extensión en fase sólida sobre la hPCSK9 directamente recubierta, se lleva a cabo de acuerdo con el protocolo de la primera ronda, pero con una mayor restringencia en el procedimiento de lavado.

La segunda variante de extensión es la extensión en solución contra la hPCSK9 humana biotinilada: para la extensión en solución,

224

utilizando la hPCSK9 biotinilada acoplada con Dynabeads M-280 (Dyna), se aplica el siguiente protocolo: los tubos Eppendorf de 1.5 mililitros se bloquean con 1.5 mililitros de albúmina de suero bovino al 1 por ciento en suero regulado con fosfato durante la noche a 4°C.

5 200 microlitros de Dynabeads M-280 (Dyna) magnéticas recubiertas con estreptavidina se lavan una vez con 200 microlitros de suero regulado con fosfato, y se vuelven a suspender en 200 microlitros de 1xChemiblocker (diluido en 1x PBS). El bloqueo de la perlas se lleva a cabo en tubos previamente bloqueados durante la noche a 4°C. Los

10 fagos diluidos en 500 microlitros de suero regulado con fosfato para cada condición de extensión se mezclan con 500 microlitros de 2xChemiblocker/Tween al 0.1 por ciento durante 1 hora a temperatura ambiente (rotador). La pre-adsorción de los fagos se lleva a cabo dos veces: se agregan 50 microlitros de perlas

15 magnéticas de estreptavidina bloqueadas a los fagos bloqueados, y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente sobre un rotador. Después de la separación de las perlas por medio de un dispositivo magnético (Dyna MPC-E), el sobrenadante del fago (aproximadamente 1 mililitro) se transfiere a un nuevo tubo

20 bloqueado, y se repite la pre-adsorción sobre 500 microlitros de perlas bloqueadas durante 30 minutos. Entonces se agrega la hPCSK9 biotinilada 200 nM a los fagos bloqueados en un nuevo tubo de 1.5 mililitros bloqueado, y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente sobre un rotador. Se agregan 100 microlitros de perlas

25 magnéticas de estreptavidina bloqueadas a cada grupo de fagos de

extensión, y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente sobre un rotador. Los fagos enlazados con la hPCSK9 biotinilada se inmovilizan en las perlas magnéticas, y se recolectan con un separador de partículas magnéticas (DynaL MPC-E). Luego las perlas se lavan siete veces en suero regulado con fosfato/Tween al 0.05 por ciento utilizando un rotador, seguido por lavado otras tres veces con suero regulado con fosfato. La elución del fago a partir de las Dynabeads se lleva a cabo agregando 300 microlitros de DTT 20 mM en Tris/HCl 10 mM, pH de 8, a cada tubo, durante 10 minutos. Las Dynabeads se remueven mediante el separador de partículas magnéticas, y se agrega al sobrenadante a 14 mililitros de un cultivo de TG1 de *E. coli* cultivado hasta una OD_{600nm} de 0.6 a 0.8. Luego se lavan las perlas una vez con 200 microlitros de suero regulado con fosfato, y junto con los fagos adicionalmente removidos, se agrega el suero regulado con fosfato a los 14 mililitros de cultivo de TG1 de *E. coli*. Para la infección del fago, el cultivo se incuba en tubos de plástico de 50 mililitros durante 45 minutos a 37°C sin agitación. Después de la centrifugación durante 10 minutos a 5,000 revoluciones por minuto, los gránulos bacterianos se suspenden cada uno en 500 microlitros del medio 2xYT, se aplican a las placas de agar 2xYT-CG, y se incuban durante la noche a 30°C. Entonces se raspan las colonias de las placas, y los fagos se rescatan y se amplifican como se describe anteriormente.

Las segunda y tercera rondas de la extensión en solución sobre la hPCSK9 biotinilada, se llevan a cabo de acuerdo con el

286

protocolo de la primera ronda, excepto que con mayor restringencia en el procedimiento de lavado.

Subclonación y expresión de los fragmentos Fab solubles

Los insertos que codifican Fab de los fagémidos HuCAL
5 GOLD® seleccionados se subclonan en el vector de expresión
pMORPH®X9_Fab_FH, para facilitar la expresión rápida y eficiente
de los Fabs solubles. Para este propósito, el ADN del plásmido de
los clones seleccionados se digiere con *Xba*I y *Eco*RI, cortando de
esta manera el inserto que codifica Fab (ompA-VLCL y phoA-Fd), y
10 se clonan en el vector de expresión digerido con *Xba*I/*Eco*RI
pMORPH®X9_Fab_FH. Los Fabs expresados a partir de este vector
llevan dos marcas C-terminales (FLAG^{MR} y 6xHis, respectivamente)
tanto para la detección como para la purificación.

Microexpresión de anticuerpos Fab HuCAL GOLD® en E. coli

15 Se utilizan colonias individuales resistentes al cloranfenicol
obtenidas después de la subclonación de los Fabs seleccionados en
el vector de expresión pMORPH®X9_Fab_FH, para inocular los
pozos de una placa de microtitulación de 96 pozos estéril que
contiene 100 microlitros del medio 2xYT-CG por pozo, y se cultivan
20 durante la noche a 37°C. Se transfieren 5 microlitros de cada cultivo
de TG1 de *E. coli* a una placa de microtitulación de 96 pozos estéril
fresca previamente llenada con 100 microlitros del medio 2xYT
complementado con 34 microgramos/mililitro de cloranfenicol y
glucosa al 0.1 por ciento por pozo. Las placas de microtitulación se
25 incuban a 30°C, agitando a 400 revoluciones por minuto sobre un

27A

agitador de microplacas, hasta que los cultivos quedan ligeramente turbios (de aproximadamente 2 a 4 horas) con una OD_{600nm} de aproximadamente 0.5.

5 A estas placas de expresión, se les agregan 20 microlitros del medio 2xYT complementado con 34 microgramos/mililitro de cloranfenicol e IPTG 3 mM (isopropil- β -D-tiogalactopiranosida) por pozo (concentración final de IPTG 0.05 mM); las placas de microtitulación se sellan con una cinta permeable al gas, y las placas se incuban durante la noche a 30°C agitando a 400 revoluciones por
10 minuto.

Generación de los lisados celulares enteros (extractos BEL): Los gránulos celulares bacterianos se congelaron sobre hielo seco, y luego se volvieron a suspender en suero regulado con fosfato conteniendo 1 miligramo/mililitro de lisozima, MgCl₂ 2 mM y
15 benzonasa, y se incubaron durante 1 hora sobre el agitador. Los lisados se bloquearon mediante la adición de albúmina de suero bovino en una concentración final del 1 por ciento, y se agregaron los lisados aclarados a las placas ELISA apropiadamente recubiertas para evaluar el enlace con la PCSK9. Los extractos BEL se utilizaron
20 para el análisis de enlace mediante ELISA.

Técnicas de ensayo inmunosorbente enlazado con enzima (ELISA)

5 microgramos/mililitro de la hPCSK9 recombinante humana en suero regulado con fosfato se recubren en placas Maxisorp de 384
25 pozos (Nunc-Immunoplate) durante la noche a 4°C. Después del

228

recubrimiento, los pozos se lavan una vez con suero regulado con fosfato/Tween al 0.05 por ciento (PBS-T), y dos veces con suero regulado con fosfato. Entonces los pozos se bloquean con PBS-T con albúmina de suero bovino al 2 por ciento durante 2 horas a temperatura ambiente. En paralelo, se incuban 15 microlitros del extracto BEL y 15 microlitros de PBS-T con albúmina de suero bovino al 2 por ciento durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas Maxisorp bloqueadas se lavan tres veces con PBS-T antes de agregar 10 microlitros de los extractos BEL bloqueados a los pozos, y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la detección de los anticuerpos Fab primarios, se aplican los siguientes anticuerpos secundarios: fragmento F(ab')₂ AffiniPure conjugado con fosfatasa alcalina (AP), IgG de cabra anti-humano, anti-ratón, o anti-oveja (Jackson Immuno Research). Para la detección de los conjugados con fosfatasa alcalina, se utilizan sustratos fluorogénicos como AttoPhos (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Entre todos los pasos de incubación, los pozos de la placa de microtitulación se lavan con PBS-T tres veces, y tres veces después de la incubación final con el anticuerpo secundario. La fluorescencia se puede medir utilizando un lector de placas Thermo Multiskan.

Expresión de anticuerpos Fab HuCAL GOLD® en E. coli, y purificación

La expresión de los fragmentos Fab codificados por pMORPH®X9_Fab_FH en células TG-1 se lleva a cabo en cultivos en

mg

matraces de agitación utilizando 750 mililitros del medio 2xYT complementado con 34 microgramos/mililitro de cloranfenicol. Los cultivos se agitan a 30°C hasta que la OD_{600nm} llega a 0.5. La expresión se induce mediante la adición de IPTG 0.75 mM durante 20 horas a 30°C. Las células se alteran utilizando lisozima, y los fragmentos Fab se aíslan mediante cromatografía con Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Alemania). Las concentraciones de proteína se pueden determinar mediante espectrofotometría ultravioleta (Krebs y colaboradores, *J. Immunol. Methods* 254, 67-84 (2001)).

10 **Ejemplo 2: Maduración por afinidad de Fabs anti-PCSK9 seleccionados, mediante intercambio paralelo de casetes de LCDR3 y HCDR2**

Generación de bibliotecas Fab para la maduración por afinidad

Con el objeto de aumentar la afinidad y la actividad inhibidora de los anticuerpos anti-PCSK9 identificados, los clones Fab se someten a maduración por afinidad. Para este propósito, las regiones determinantes de complementariedad se optimizan mediante mutagénesis de casete, utilizando mutagénesis dirigida al trinucleótido (Virnekas y colaboradores, *Nucleic Acids Res.* 22, 5600-5607, 1994).

El siguiente párrafo describe brevemente un protocolo que se puede emplear para la clonación de las bibliotecas de maduración y la optimización de Fab. Los fragmentos Fab del vector de expresión pMORPH[®]X9_Fab_FH se clonan en el vector de fagémido pMORPH[®]25 (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica

MC

Número 6,753,136). Se aplican dos estrategias diferentes en paralelo para optimizar tanto la afinidad como la eficacia de los Fabs progenitores.

Se generan bibliotecas de anticuerpo Fab de fago, en donde la
5 LCDR3 de seis candidatos de maduración seleccionados (clones "progenitores") es reemplazada por un repertorio de secuencias de CDR3 de cadena ligera individuales. En paralelo, la región HCDR2 de cada clon progenitor es reemplazada por un repertorio de secuencias de CDR2 de cadena pesada individuales. Se generan
10 bibliotecas de maduración por afinidad mediante procedimientos de clonación convencionales y transformación de los clones diversificados en células TOP10F' de *E. coli* electro-competentes (Invitrogen). Los fagos que presentan Fab se preparan como se describe en el Ejemplo 1. Los grupos de maduración que
15 corresponden a cada biblioteca se construyen y se mantienen separados durante el siguiente proceso de selección.

Estrategias de extensión de maduración

Se llevan a cabo extensiones utilizando los cuatro grupos de anticuerpos sobre la hPCSK9 recombinante biotinilada en solución
20 por tres rondas, respectivamente, como se describe en el Ejemplo 1, extensión de solución contra hPCSK9 biotinilada. Se aumenta la restringencia de la selección mediante la reducción del antígeno biotinilado de ronda de extensión a ronda de extensión, mediante pasos de lavado prolongados, y mediante la adición de antígeno no
25 biotinilado para la selección fuera de índice.

231

**Análisis de enlace basado en electroquimiluminiscencia
(BioVeris), para la detección de Fab de enlace de hPCSK9 en
lisados bacterianos**

Se analiza el enlace de los anticuerpos Fab optimizados en
5 lisados de *E. coli* (extractos BEL) con la hPCSK9 en BioVeris M-
SERIES® 384 Analyzer BioVeris, Europa, Witney, Oxfordshire, Reino
Unido). Los extractos BEL se diluyen en regulador de ensayo (suero
regulado con fosfato /Tween 20 al 0.05 por ciento/albúmina de suero
bovino al 0.5 por ciento), para utilizarse en el rastreo BioVeris. La
10 hPCSK9 biotinilada se acopla con perlas paramagnéticas
recubiertas con estreptavidina; el (Fab)₂ anti-humano (Dianova) se
marcó con rutenio utilizando la marca BV-tag^{MR} (BioVeris Europa,
Witney, Oxfordshire, Reino Unido). Este anticuerpo secundario se
agrega a las perlas acopladas con hPCSK9 antes de medirse en el
15 Analizador BioVeris M-SERIES® 384 Analyzer. Se conduce el análisis
de secuencia de los impactos a partir del rastreo BioVeris para
identificar los clones de Fab. Los anticuerpos Fab seleccionados se
sub-clonan en el formato IgG1.

Determinación de las afinidades picomolares utilizando

20 **Titulación en Equilibrio en Solución (SET)**

Para la determinación de la K_D , se utilizan fracciones de
monómeros (contenido de monómero de cuando menos el 90 por
ciento, analizado mediante SEC analítica; Superdex75, Amersham
Pharmacia) de Fab. La determinación de afinidad basada en la
25 electroquimiluminiscencia (ECL) en solución, y la evaluación de los

292

datos, se pueden llevar a cabo esencialmente como es descrito por Haenel y colaboradores, 2005. Se equilibra una cantidad constante de Fab con diferentes concentraciones (diluciones en serie 3ⁿ) de la hPCSK9 recombinante en solución. Se agrega la hPCSK9 biotinilada acoplada con perlas paramagnéticas (Estreptavidina M-280, Dynal), y (Fab)'₂ anti-humano (Dianova) marcado con BV-tag^{MR} (BioVeris Europa, Witney, Oxfordshire, Reino Unido), y la mezcla se incuba durante 30 minutos. Subsiguientemente, se cuantifica la concentración del Fab no enlazado por medio de detección ECL utilizando el analizador M-SERIES[®] 384 Analyzer (BioVeris Europa).

La determinación de afinidad con PCSK9 de otra especie (por ejemplo, chimpancé o cinomolgo) en solución, se hace esencialmente como se describe en lo anterior, reemplazando la PCSK9 humana con la PCSK9 de chimpancé o de cinomolgo. Para la detección del Fab libre, se utiliza la hPCSK9 biotinilada acoplada con perlas paramagnéticas. Las afinidades se calculan de acuerdo con Haenel y colaboradores (2005 *Anal Biochem.* 339, 182-184).

Ejemplo 3. Generación de Fab Anti-PCSK9 mediante Exhibición de Fagos

Se generó el Fab anti-PCSK9 empleando las siguientes técnicas de exhibición de fagos. La PCSK9 humana purificada se marcó con biotina PEO4 (Pierce, 21329) empleando el protocolo del fabricante, utilizando una proporción molar de 20:1 de biotina:PCSK9. Las bajas proporciones molares aseguran una modificación limitada de la proteína que se está marcando, y la

elección del enlazador PEO4 separa la fracción de biotina de la proteína, y mejora la hidrofiliicidad global de la proteína biotinilada. La PCSK9 humana biotinilada se utilizó para recubrir las perlas de estreptavidina Dynal M280, y la biblioteca Morphosys Hucal se extendió por 3 rondas empleando técnicas de extensión convencionales. Después de tres rondas iterativas de extensión, el ADN del plásmido de la ronda 3 reservado se purificó y se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI. El ADN del plásmido se separó mediante electroforesis en gel de agarosa, y el inserto de 1.5 kB que contenía dos segmentos del gen (cadena pesada (VH/CH) y cadena ligera (VL/CL) de inmunoglobulina) se separó y se purificó. Este fragmento de 1.5 kB (inserto Fab) se sub-clonó en el vector de expresión Morphosys pMORPHX9_FH, y se transformó en células TG-1 electrocompetentes. Se recogieron las colonias individuales, y se prepararon las placas maestras. Las placas hijas inoculadas a partir de las placas maestras se volvieron a cultivar en un medio bajo en glucosa, y se indujo la expresión de Fab mediante cultivo en la presencia de IPTG durante la noche. Los gránulos celulares se congelaron, se lisaron con lisozima, y los lisados aclarados se evaluaron mediante ELISA sobre placas recubiertas con PCSK9 biotinilada con PEO recubierta sobre pozos recubiertos con neutravidina (controles negativos de neutravidina sola). Los positivos para ELISA se volvieron a probar siguiendo el re-rayado de la placa maestra sobre placas de ágar, y recogiendo 3 colonias individuales para la re-prueba. También se preparó el ADN del plásmido a partir

234

de los clones de PCSK9 para la secuenciación del ADN. La proteína de Fab a partir de los clones únicos se preparó en cultivos a escala en litros inducidos con IPTG, y luego se purificó en secuencia mediante IMAC y cromatografía por exclusión de tamaños. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante ensayo de Bradford acoplado con SDS-PAGE.

Ejemplo 4: ELISA Competitivo de PCSK9

La PCSK9 humana purificada marcada con NHS-PEO4-biotina (Pierce, 21329) se utilizó para recubrir las placas Nunc Maxisorp recubiertas con neutravidina. En seguida del bloqueo del enlace no específico con albúmina de suero bovino, los pozos recubiertos con PCSK9 se incubaron primero con una concentración de saturación de un Fab anti-PCSK9 humana (Fab de control positivo), o con el regulador solo. En seguida del enlace del Fab de control positivo (o del regulador solo), se agregaron Fabs anti-PCSK9 humana alternados (Fab de prueba) tanto a los pozos con regulador solo como a los pozos tratados con Fab anti-PCSK9 humana. Después de los pasos de incubación y lavado, se detectaron los fragmentos de anticuerpo enlazados con la PCSK9 humana enlazada a la placa, utilizando un cóctel de anticuerpos de cadena ligera de cabra anti-humano conjugados con peroxidasa, con sustrato d 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina (TMB). Los Fabs que compiten por sitios de enlace similares o traslapados sobre la PCSK9 humana, fracasan para provocar señales de enlace adicionales (es decir, competición de enlace por sitios similares o traslapados sobre la PCSK9

31

humana), comparándose con el Fab solo de control positivo. De una manera alternativa, los Fabs que se enlazan independientemente del Fab de control positivo, exhiben más señales de enlace, como se refleja por los mayores niveles de conversión del sustrato de TMB (es decir, enlace no competitivo de Fabs con la PCSK9 humana). Empleando esta estrategia, los Fabs se agruparon basándose en la capacidad de los miembros para bloquear el enlace de unos y otros con la PCSK9 humana. La caracterización inicial con el Fab H1-anti-PCSK9 como el Fab de control positivo, dividió los anticuerpos en dos grupos: inhibidos por H1 (grupo 1) o no inhibidos por H1 (grupo 2). Otros experimentos de competición de enlace demostraron que los Fabs dentro de cada grupo inhibieron el enlace de los otros miembros de ese grupo. A partir de estos estudios, se identificó un tercer grupo de Fabs (grupo 3) en virtud de no competir con ninguno de los Fabs del grupo 1 o del grupo 2. La agrupación de Fab se utilizó como una guía para determinar cuáles de los Fabs anti-PCSK9 caracterizar para la afinidad de enlace, la capacidad para alterar el hPCSK9/LDL-R, y los efectos sobre las células HepG2. Entonces se mapeó el sitio de enlace preciso sobre la PCSK9 humana de los Fabs con las propiedades deseadas *in vitro*, tal como H1, empleando técnicas biofísicas, tales como DXMS, como se ilustra en el Ejemplo 4.

Ejemplo 5: Análisis Funcional de Fab Anti-PCSK9

En este Ejemplo, se examinaron las propiedades funcionales del Fab H1-anti-PCSK9 incluyendo afinidad de enlace, capacidad

para alterar el hPCSK9/LDL-R, y los efectos sobre las células HepG2.

1. *Afinidad de Enlace*

5 Se llevaron a cabo ensayos de enlace Biacore a 25°C en un instrumento T100. Se utilizó HBS-P+Ca (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH de 7.4, P-20 al 0.005 por ciento, CaCl₂ 2 mM) como el regulador de ejecución. Para la inmovilización, la hPCSK9 se diluyó en un regulador de acetato a un pH de 5.5 a 30 microgramos/
10 mililitro, justo antes de usarse. Se inmovilizaron aproximadamente 200 RU de hPCSK9 sobre un chip sensor CM5 (Serie S) siguiendo el protocolo de acoplamiento de amina convencional. Se inyectaron soluciones de Fab (de 0 a 20 nM, diluido en el regulador de ejecución) sobre la PCSK9 y la superficie de referencia
15 (acoplamiento de amina de control) a una velocidad de flujo de 30 microlitros/minuto. La superficie de la PCSK9 se regeneró con una inyección de 60 segundos de NaOH 1 mM y NaCl 1 M.

 Todos los análisis de datos se hicieron utilizando el software BIAevaluation. Las curvas de enlace se corrigieron con doble
20 referencia, primero con la curva de enlace de la celda de referencia, seguida por la curva de enlace del control del regulador de ejecución. Luego los datos se analizaron globalmente con un modelo de enlace de 1:1 para extraer la constante de enlace K_D (nM), la constante de índice de asociación (k_a , 1/Ms), y la constante de índice
25 de disociación (k_d , 1/s).

CBX

Se determinó que H1-Fab exhibió una k_a de 3.23×10^5 (1/Ms), una k_d de 3.41×10^{-3} (1/s), y una K_D de 1.05×10^{-8} M (Figura 3).

2. Capacidad del Fab H1-Anti-PCSK9 para Alterar

5 hPCSK9/LDL-R

Se llevó a cabo un ensayo de alteración FRET de PCSK9/LDL-R como sigue, para evaluar la capacidad de H1-Fab para alterar la interacción de hPCSK9/LDL-R. El dominio extracelular de LDL-R (Ala 22-Arg 788) (R&D Systems) se marcó con criptato de europio (LDL-R-Eu) (Perkin Elmer) y la proteína purificada PCSK9 se marcó con Alexa Fluor 647 (PCSK9-Alexa) (Invitrogen). El regulador de ensayo consistió en HEPES 20 mM (pH de 7.0), NaCl 150 mM, CaCl_2 2 mM, Tween 20 al 0.1 por ciento, y 1 miligramo/mililitro de albúmina de suero bovino. El Fab se incubó previamente con PCSK9-Alexa a 10 temperatura ambiente durante 30 minutos antes de agregar el LDL-R-Eu. La concentración final de PCSK9-Alexa y LDL-R-Eu fue de 8 nM y 1 nM, respectivamente. Después de dos horas de incubación, la placa se leyó en un Envision (Perkin Elmer) con las siguientes posiciones: excitación a 330 nanómetros, y emisiones a tanto 620 15 nanómetros como a 665 nanómetro, demora de 100 μs entre excitación y lecturas. La proporción de la lectura a 665 nanómetros sobre la lectura a 620 nanómetros se normaliza y se reporta en la 20 Figura 4.

Como se muestra en la Figura 4, H1-Fab alteró la interacción 25 de hPCSK9/LDL-R.

230

3. *Efecto sobre células HepG2*

Se midió la absorción de LDL empleando citometría de flujo.

Las células HepG2 (ATCC) se mantuvieron en DMEM con suero bovino fetal (FBS) al 10 por ciento (volumen/volumen). Las células se sembraron en una placa de 96 pozos recubierta con colágeno (BD Biosciences), la noche anterior al tratamiento con el anticuerpo de PCSK9. Se incubaron previamente 200 nM de proteína PCSK9 con el Fab anti-PCSK9 en las concentraciones indicadas durante 30 minutos antes de agregarse a las células.

Después del tratamiento con PCSK9 y Fab durante 3 horas, se agregó dil-LDL (Intracel) directamente a cada pozo hasta una concentración final de 5 microgramos/mililitro, y se incubó durante una hora adicional a 37°C, con CO₂ al 5 por ciento. Las células se tripsinizaron, se cosecharon, y las células positivas para dil-LDL se midieron mediante citometría de flujo (LSRII, BD Biosciences). Se analizaron las medias geométricas utilizando el software FlowJo 5.7.2, normalizadas con el control de regulador, y se reportan en la Figura 4.

También se midió el LDL superficial utilizando citometría de flujo (Figura 4B). Las células HepG2 se tripsinizaron, se sembraron en una placa recubierta con colágeno, y se incubaron durante la noche a 37°C con CO₂ al 5 por ciento, para permitir la recuperación de la expresión de LDL-R. Al día siguiente, la proteína PCSK9 y el Fab de PCSK9 se mezclaron previamente durante 30 minutos antes de la incubación con las células durante 4 horas. Las células se

ncl

cosecharon con Versene (Invitrogen), y se bloquearon con suero de burro (Jackson ImmunoResearch Laboratories) antes del teñido con un anticuerpo policlonal de conejo anti-LDL-R humano (Fitzgerald), y subsiguientemente con anticuerpo de burro anti-IgG de conejo conjugado con APC (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Después de lavarse, las células se fijaron con para-formaldehído al 2 por ciento, y se sometieron a análisis de citometría de flujo en un citómetro BD LSR-II. Los promedios de las medias geométricas se calcularon utilizando el software FlowJo 5.7.2, y se reportan en la Figura 4.

Como se muestra en la Figura, H1-Fab condujo a mayores niveles superficiales de LDL-R (Figura 4B) y a una mayor absorción de LDL por parte de las células Hep2 (Figura 4C).

Ejemplo 6: Mapeo de Epítomos

En este Ejemplo, se utilizó espectrometría de masas con intercambio de deuterio (DXMS) para determinar los epítomos reconocidos por H1-Fab como sigue.

A. Materiales

El diluyente de proteína (H_2O o D_2O) fue fosfato de sodio 20 mM, pH de 7.3 con NaCl 150 mM. La solución de apagado fue ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.5 por ciento (volumen/volumen) en agua. Todos los demás productos químicos se adquirieron en Sigma, y los solventes de grado de HPLC fueron de Fisher Scientific. Se prepararon incubaciones de Proteína:Fab, y se dejaron incubarse durante cuando menos 2 horas a $4^{\circ}C$.

B. Intercambio de Hidrógeno/Deuterio (H/D) en Solución

Los experimentos de espectrometría de masas automatizada con intercambio de Hidrógeno/Deuterio se llevaron a cabo con un establecimiento similar y una forma similar a los descritos en la literatura (*Anal. Chem.* 2006, 78, 1005-1014). En resumen, se utilizó un manejador de líquidos LEAP Technologies Pal HTS (LEAP Technologies, Carrboro, NC) para todas las operaciones de manejo de líquidos. El manejador de líquidos se controló mediante escritos de automatización en la Cubierta LEAP, que fueron codificados por el fabricante. El robot se alojó en un recinto refrigerado mantenido a 2°C. Las placas para muestra, diluyente, y solución de apagado, se cargaron en las charolas del manejador de líquidos antes del inicio de una secuencia experimental. También se montaron una válvula de inyección de 6 compuertas y una estación de lavado sobre el riel del manejador de líquidos, y se facilitaron la inyección de muestra en el sistema cromatográfico y el lavado de la jeringa, respectivamente. El sistema cromatográfico consistió en dos válvulas adicionales, una columna de enzima, un cartucho de trampa de fase inversa, y se alojó una columna analítica en una cámara separada construida en casa y mantenida a 2°C mediante pilas de peltre. Las conexiones de fluido y la adaptación de la pepsina inmovilizada, el cartucho de trampa de fase inversa, y la columna analítica a las válvulas, se ilustran en la Figura 5. Las válvulas y columnas se configuraron de tal manera que se permitiera la digestión de proteína, la desalinización del péptido, y la cromatografía en fase inversa en

línea, antes de la introducción de la muestra en la fuente de ionización por electropulverización (ESI) del espectrómetro de masas. Las corrientes de fluido requeridas para la operación fueron proporcionadas por dos sistemas de HPLC Agilent separados (Agilent

5 1100, Palo Alto, CA). La primera bomba de HPLC (bomba de carga) suministró ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.05 por ciento (volumen/volumen) en agua a 125 microlitros/minuto. Las posiciones de la válvula durante la fase de carga se ilustran en la Figura 5A. En esta fase, la muestra se transfiere desde el ciclo de muestra a través del

10 cartucho de pepsina inmovilizada (2 milímetros x 20 milímetros, amablemente proporcionado por el Profesor Virgil Woods de UCSD), hasta un cartucho de trampa de fase inversa (1 milímetro x 8 milímetros, Michrom Bioresources Inc., Auburn, CA). Posteriormente, se conmutó la válvula auxiliar 2 de tal manera que la segunda bomba

15 de HPLC (bomba de gradiente) suministrara un gradiente a través del cartucho de trampa de fase inversa y la columna analítica, hasta la válvula auxiliar 3. El cartucho de enzima inmovilizada se aisló hacia el desecho en esta posición. La válvula auxiliar 3 se programó para desviar el flujo hacia el desecho durante un período de tiempo

20 previamente establecido para la desalinización (Figura 5B) de la muestra cargada sobre el cartucho de trampa. Después del período de desalinización, la válvula se conmutó para permitir el flujo desde la bomba de gradiente para alcanzar la fuente de iones del espectrómetro de masas (después de pasar a través del cartucho de

25 trampa y la columna analítica, Figura 5C). La bomba de gradiente

suministró un gradiente del 0 al 40 por ciento de la fase móvil B durante 55 minutos a 50 microlitros/minuto (fase móvil A = ácido fórmico al 0.2 por ciento en agua, B = ácido fórmico al 0.2 por ciento en acetonitrilo).

5 **C. Espectrometría de Masas**

La Espectrometría de Masas en Fila con Ionización por Electropulverización con Cromatografía de Líquidos (LC-ESI-MS) se llevó a cabo en un QToF Ultima Global (Waters, Milford, MA) operado en el modo V. Se llevaron a cabo dos experimentos de conmutación de MS/MS dependiente de los datos para recolectar los espectros de masas en fila para el propósito de identificar las secuencias de los péptidos generados por la proteólisis en línea. Las adquisiciones realizadas para el propósito de la determinación del nivel de deuteración fueron solamente de MS (exploraciones de 5 segundos sobre m/Z 400-1500).

D. Experimentos de Intercambio de Hidrógeno/Deuterio (H/D) Complementarios

La proteína (hPCSK9 y su pro-dominio PD) se sometió a varias condiciones de intercambio activado y desactivado, siendo el resultado neto esperado una marca de cualquier epítipo potencial por un incremento en los niveles de deuteración con respecto al control en el experimento de protección (descrito más adelante), y una reducción en el nivel de deuteración con respecto al control en el experimento de In-D₂O (descrito más adelante).

25 La deuteración, que es el intercambio de hidrógenos de amida

sobre la proteína con deuterio, es una herramienta especialmente útil para el sondeo de la estructura y función de las proteínas, debido a que el marcado con deuterio no cambia la estructura o función de la proteína marcada. El deuterio es un isótopo de hidrógeno que tiene el doble de la masa del hidrógeno, indicado en la Figura 6 por las estrellas. Esto contrasta mucho con otros métodos de marcado que unen nuevas fracciones a los grupos funcionales existentes sobre las proteínas.

1. *Experimento de Protección*

En el experimento de protección, se preparó la solución de proteína deuterada mediante incubación durante la noche de la proteína en fosfato de sodio 20 mM, pH de 7.3, con NaCl 150 mM en D₂O. En el experimento de control, la proteína deuterada se diluyó con H₂O y, después de diferentes períodos de tiempo de intercambio desactivado (por ejemplo, 5 minutos), se agregó la solución de apagado. Esto fue seguido por la digestión en línea con pepsina y por la LCMS como se describe anteriormente. El intercambio desactivado del complejo de proteína:Fab se llevó a cabo mediante la dilución de la solución de proteína deuterada con una cantidad equimolar de solución de Fab (no deuterada, véase el esquema de la Figura 6, columna de la derecha), e incubación durante 15 minutos para formar el complejo de proteína (deuterada):Fab. Después de la formación del complejo, la muestra se trató como se describe más adelante para el control.

La columna de la izquierda de la Figura 6 ilustra la secuencia

experimental para el experimento de protección, el cual empieza con la PCSK9 deuterada. "Deuterada" significa que los hidrógenos de amida de la proteína han sido reemplazados con deuterio mediante la incubación de la proteína en regulador de deuterio durante un período de varias horas. Como se ilustra en la segunda fila de la columna de la izquierda de la Figura 6, el enlace del Fab con su epítipo sobre la proteína PCSK9 deuterada, bloqueará parte de la superficie de la PCSK9 alrededor del área del epítipo. El bloqueo de la superficie también reduce el acceso del solvente, que es crítico para que se presente el intercambio de hidrógeno/deuterio. En la tercera fila de la columna de la izquierda de la Figura 6, se ilustra el efecto de la incubación del complejo de PCSK9 deuterada/Fab en regulador no deuterado.

Como se muestra en la Figura 6, los niveles de deuteración sobre PCSK9 se reducen rápidamente sobre las áreas accesibles al solvente, debido a que el intercambio de hidrógeno/deuterio se puede presentar libremente. En contraste, el acceso reducido del solvente al área del epítipo debido a la acción de bloqueo del Fab que cubre la superficie, hace que se haga más lento el intercambio de hidrógeno/deuterio. Esto da como resultado la conservación de la mayor parte de la deuteración en el área del epítipo.

Es posible localizar los mayores niveles de deuteración (marcado del epítipo) a lo largo de la secuencia de la proteína mediante el corte del complejo de proteína:Fab en pedazos más pequeños con una enzima, y midiendo el nivel de deuteración de

245

cada uno de los fragmentos con un espectrómetro de masas. Esto es posible debido al cambio de masa que resulta de la deuteración, ya que el deuterio es más pesado que el hidrógeno. La reunión de la información recolectada de los fragmentos permite derivar la distribución del deuterio a través de la secuencia de la proteína.

2. *Control*

Debido a que los niveles de deuteración varían mucho a través de la secuencia de la proteína debido a la estructura de la proteína y a la variación resultante en la accesibilidad del solvente, así como a las diferencias en las velocidades de intercambio de hidrógeno/deuterio observadas para los enlaces de amida formados entre diferentes aminoácidos, es imposible concluir exclusivamente a partir de un nivel de deuteración elevado observado en el experimento de protección (descrito por la columna de la izquierda de la Figura 6) sobre la presencia de un epítipo. Afortunadamente, la variación natural de los niveles de deuteración se cancela en un experimento diferencial. El experimento diferencial consiste en la medición de los niveles de deuteración en la presencia o en ausencia (experimento de control, columna central de la Figura 6) del Fab, y el cálculo de la diferencia en la deuteración. Las diferencias observadas en el nivel de deuteración se pueden atribuir puramente a los efectos del Fab, y los valores grandes indicarán la presencia y localización de los epítipos.

3. *Experimento de In-D₂O*

Adicionalmente, se puede llevar a cabo un experimento

246

diferencial complementario (es decir, un experimento de $\text{In-D}_2\text{O}$) ilustrado en la columna de la derecha de la Figura 6, y se deduce el resultado esperado empleando un razonamiento similar al adelantado para el experimento de la columna de la izquierda. La mayor
5 diferencia es que la diferencia observada en la deuteración para el experimento de la columna de la derecha debe ser de un signo opuesto a aquél de la columna de la izquierda, y por consiguiente, debe proporcionar una evidencia complementaria para la presencia y localización de un epítipo potencial, así como la validación de los
10 resultados unos contra otros.

En un experimento de $\text{In-D}_2\text{O}$ típico (véase el esquema de la Figura 6, columna de enmedio y de la derecha), se diluye la proteína (control), o alternatively el complejo de proteína:Fab, en regulador de D_2O . Después de un período fijo de intercambio
15 activado, la mezcla se diluye adicionalmente con regulador de HO para provocar el intercambio desactivado, y finalmente se apaga con regulador de apagado. Una vez mezclada, la solución apagada se proteoliza de una manera totalmente automática, se separa, y se analiza mediante LCMS como se describe anteriormente. Se
20 emplearon diferentes períodos de incubación con D_2O (por ejemplo, 45 segundos) en el experimento, para optimizar las diferencias observadas en la deuteración entre el control (proteína solamente) y la muestra de proteína:Fab. El cambio promedio en la deuteración entre la muestra y el control se calculó como la diferencia entre los
25 niveles de absorción de deuterio de la muestra y del control, en

donde los niveles de absorción de deuterio se determinaron como se describe en seguida bajo el procesamiento de datos.

E. Procesamiento de Datos

Las adquisiciones de la MS en fila se redujeron a las listas de
5 picos utilizando MassLynx (Waters, Milford, MA), y se buscaron
contra la secuencia de la proteína utilizando Mascot (Matrix
Sciences, Londres, Reino Unido). Se validó manualmente una lista
de las identificaciones de secuencias de péptidos probables
regresadas por la búsqueda de la base de datos. Se utilizó MassLynx
10 para generar cromatogramas de un solo ion de las masas de iones
precursoras validadas. Los espectros de masas de las distribuciones
isotópicas de cada precursor se sumaron a través del pico
cromatográfico, se suavizaron, y se centraron, para determinar el
nivel de absorción de deuterio. Con el fin de asignar un nivel de
15 absorción de deuterio a cada residuo de la secuencia de la proteína,
se siguió el siguiente procedimiento. A los residuos se les asignó la
absorción de deuterio normalizada de los péptidos que los cubrían.
Si más de un péptido cubría al mismo residuo, se utilizó el promedio
de la absorción de deuterio normalizada de todos los péptidos que
20 cubrían a ese residuo. La absorción de deuterio normalizada para
cada péptido se calculó dividiendo el nivel de deuteración observado
entre el número de aminoácidos en ese péptido.

F. Resultados

En la Figura 7 se muestra el cambio promedio observado en la
25 deuteración para el experimento de protección y de $\text{In-D}_2\text{O}$ llevado a

248

cabo sobre hPCSK9 y el complejo de hPCSK9:H1-Fab como una función del número de residuos de hPCSK9 (pro-dominio incluido; se excluye el dominio rico en cisteína, debido a que no fue cubierto por los experimentos). En la Figura 7 también se muestran las

5 secuencias de aminoácidos de las regiones que muestran el comportamiento esperado de un epítipo potencial.

La Figura 7A muestra el cambio en la deuteración para el experimento de protección. El cambio en la deuteración se define como la diferencia entre el nivel de deuteración del experimento

10 ilustrado en la Figura 6 (columna de la izquierda, con Fab presente) y su control (columna de enmedio, sin Fab). El cambio en la deuteración se grafica como el cambio de masa promedio por residuo sobre el número de residuos para los residuos de aminoácidos 40 a

15 420 de la secuencia de PCSK9 (empezando con el pro-dominio, y excluyendo el dominio rico en cisteína). Un valor alto para el cambio en la deuteración (indicado como un cambio de masa positivo por residuo) indica un epítipo. La región de los residuos 123-132 (secuencia anotada en gráficas) sobresale en este aspecto, y por consiguiente, se considera que cubre todo o parte de un epítipo.

20 Los datos complementarios a partir del experimento de In-D₂O (ilustrado en la columna de la derecha de la Figura 6) se grafican en la Figura 7A. La comparación de las dos gráficas ilustradas en la

Figura 7 revela que el estiramiento de los residuos de aminoácidos 123-132 LVKMSGDLLE muestra el cambio anticipado de los niveles

25 de deuteración para un epítipo, como se esperaba del diseño

249

experimental (Figura 6). La región 123-132 (LVKMSGDLLE) en la estructura del cristal de hPCSK9 (véase la Figura 8) cubre parte de una hélice y ciclo, y hace un sentido físico como un epítipo potencial, debido a que es altamente accesible.

5 No inmediatamente obvia a partir de los datos mostrados en la Figura 7, hay una segunda región que se extiende en los residuos 101-107 (QAARRGY) (véase la Figura 8), que es una subsección de una región más grande, que también muestra el comportamiento complementario esperado en los niveles de deuteración de la Figura 7, que serían característicos de un epítipo potencial. Resulta que el
10 método empleado para mapear de regreso el cambio en el nivel de deuteración a partir de la deuteración de los péptidos observados sobre la secuencia primaria, tiene un efecto fuertemente suavizante, lo cual es deseable, debido a que las fluctuaciones observadas en la
15 medición son muy grandes.

 Por otra parte, esta deslocalización de los niveles de deuterio hace más difícil detectar la posible participación de la región cubierta por los residuos 101-107 en el epítipo a partir de los datos como
20 están graficados en la Figura 7. No obstante, una inspección detallada de los péptidos observados que cubren la región más grande, permite que la mayor parte del intercambio observado se atribuya a la región 101-107 mucho más corta.

 Además, es importante observar, en la estructura del cristal, que esta región más corta está espacialmente localizada justo en
25 seguida de la región 123-132, lo cual sugiere que ambos

200

estiramientos forman un epítipo no lineal de H1-Fab sobre hPCSK9. Es importante que los dos estiramientos de aminoácidos implicados por los datos de la Figura 7 forman un epítipo no lineal para H1-Fab, lo cual se correlaciona con las secuencias de aminoácidos predichas
5 SEQ ID NOs: 2 y 3, para los epítipos antigénicos de hPCSK9 (Tabla 2).

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de enlace de polipéptido de pro-proteína convertasa-subtilisina/quexina tipo 9 aislada (PCSK9), la cual
5 comprende una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo que se enlaza específicamente con una PCSK9, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro del dominio catalítico de la PCSK9 humana (SEQ ID NO:1), dentro o traslapándose con uno de los siguientes:

- 10 (a) aminoácidos 166-177 de la SEQ ID NO:1;
(b) aminoácidos 187-202 de la SEQ ID NO:1;
(c) aminoácidos 206-219 de la SEQ ID NO:1;
(d) aminoácidos 231-246 de la SEQ ID NO:1;
(e) aminoácidos 277-283 de la SEQ ID NO:1;
15 (f) aminoácidos 336-349 de la SEQ ID NO:1;
(g) aminoácidos 368-383 de la SEQ ID NO:1; o
(h) aminoácidos 426-439 de la SEQ ID NO:1.

2. Una molécula de enlace de PCSK9 aislada, la cual
comprende una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo que
20 se enlaza específicamente con una PCSK9, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro del dominio rico en cisteína de la PCSK9 humana, dentro o traslapándose con uno de los siguientes:

- (a) aminoácidos 443-500 de la SEQ ID NO: 1;
25 (b) aminoácidos 557-590 de la SEQ ID NO: 1; o

212

(c) aminoácidos 636-678 de la SEQ ID NO: 1.

3. Una molécula de enlace de PCSK9 aislada, la cual comprende una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo que se enlaza específicamente con una PCSK9, en donde la porción de
5 enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro del pro-dominio de la PCSK9 humana dentro o traslapándose con los aminoácidos 89-134 de la SEQ ID NO:1.

4. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la porción de enlace de antígeno
10 reacciona cruzadamente con una PCSK9 de un primate no humano.

5. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la porción de enlace de antígeno reacciona cruzadamente con una PCSK9 de una especie de roedor.

6. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 a 3, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo lineal.

7. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo no lineal.

20 8. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 7, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo no lineal que consiste en cuando menos una porción de cada uno de los siguientes epítopos lineales:

- 25 (a) aminoácidos 89-101 de la SEQ ID NO:1; y
(b) aminoácidos 106-134 de la SEQ ID NO:1.

263

9. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 7, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo no lineal que consiste en cuando menos una porción de cada uno de los siguientes epítipos lineales:

- 5 (a) aminoácidos 166-177 de la SEQ ID NO:1; y
 (b) aminoácidos 443-458 de la SEQ ID NO:1.

10. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 7, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo no lineal que consiste en cuando menos una porción de dos o tres de los siguientes epítipos lineales:

- (a) aminoácidos 187-202 de la SEQ ID NO:1;
 (b) aminoácidos 231-246 de la SEQ ID NO:1; y
 (c) aminoácidos 368-383 de la SEQ ID NO:1.

15. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 7, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo no lineal que consiste en cuando menos una porción de cada uno de los siguientes epítipos lineales:

- (a) aminoácidos 206-219 de la SEQ ID NO:1; y
 (b) aminoácidos 277-283 de la SEQ ID NO:1.

20. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 7, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo no lineal que consiste en cuando menos una porción de cada uno de los siguientes epítipos lineales:

- 25 (a) aminoácidos 336-349 de la SEQ ID NO:1; y
 (b) aminoácidos 426-439 de la SEQ ID NO:1.

M
W

13. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 7, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo no lineal que consiste en cuando menos una porción de dos o tres de los siguientes epítipos lineales:

- 5 (a) aminoácidos 459-476 de la SEQ ID NO:1;
 (b) aminoácidos 486-500 de la SEQ ID NO:1; y
 (c) aminoácidos 557-573 de la SEQ ID NO:1.

10 14. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 7, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo no lineal que consiste en cuando menos una porción de dos o tres de los siguientes epítipos lineales:

- (a) aminoácidos 577-590 de la SEQ ID NO:1;
 (b) aminoácidos 636-645 de la SEQ ID NO:1; y
 (c) aminoácidos 659-677 de la SEQ ID NO:1.

15 15. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 2, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza específicamente con un epítipo de la PCSK9 humana dentro o traslapándose con uno de los siguientes:

- 20 (a) aminoácidos 443-458 de la SEQ ID NO:1;
 (b) aminoácidos 459-476 de la SEQ ID NO:1;
 (c) aminoácidos 486-500 de la SEQ ID NO:1;
 (d) aminoácidos 557-573 de la SEQ ID NO:1;
 (e) aminoácidos 577-590 de la SEQ ID NO:1;
 (f) aminoácidos 636-645 de la SEQ ID NO:1; o
25 (g) aminoácidos 659-677 de la SEQ ID NO:1.

16. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 3, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza específicamente con un epítipo de la PCSK9 humana dentro o traslapándose con uno de los siguientes:

- 5 (a) aminoácidos 89-101 de la SEQ ID NO:1; o
 (b) aminoácidos 106-134 de la SEQ ID NO:1.

17. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con PCSK9 con una constante de disociación (K_D)
10 igual o menor que 10 nM.

18. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con PCSK9 con una constante de disociación (K_D)
igual o menor que 1 nM.

19. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 18, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con PCSK9 con una K_D igual o menor que 0.5 nM.

20. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 19, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con una PCSK9 humana con una K_D igual o menor que 0.1 nM.

21. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 18, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con la PCSK9 de un primate no humano con una K_D igual o menor que 0.3 nM.

22. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 18, en donde la porción de enlace de antígeno de la misma se enlaza
25

con la PCSK9 de ratón con una K_D igual o menor que 0.5 nM.

23. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la porción de enlace de antígeno es una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo humano.

24. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 23, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o "humaneered".

25. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la porción de enlace de antígeno es una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo monoclonal.

26. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 23, en donde la porción de enlace de antígeno es una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo policlonal.

27. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde la molécula de enlace de PCSK9 es un anticuerpo quimérico.

28. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde la molécula de enlace de PCSK9 comprende un fragmento Fab, un fragmento Fab', un $F(ab')_2$, o un fragmento Fv del anticuerpo.

29. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde la molécula de enlace de PCSK9 comprende un Fv de una sola cadena.

30. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde la molécula de enlace de PCSK9 comprende un diacuerpo.

5 31. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la porción de enlace de antígeno se deriva a partir de un anticuerpo de uno de los siguientes isotipos: IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

10 32. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de enlace de PCSK9 inhibe el enlace de PCSK9 con un ligando de PCSK9.

33. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de enlace de PCSK9 inhibe el enlace de PCSK9 con un receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R).

15 34. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de enlace de PCSK9 inhibe la actividad proteolítica de PCSK9.

20 35. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 34, en donde la molécula de enlace de PCSK9 inhibe la proteólisis del pro-dominio de PCSK9.

36. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de enlace de PCSK9 inhibe una disminución de LDL-R dependiente de PCSK9 sobre un hepatocito.

25 37. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 36,

82

en donde la molécula de enlace de PCSK9 inhibe la degradación de LDL-R dependiente de PCSK9 sobre los hepatocitos.

38. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de enlace de PCSK9, cuando se pone en contacto con un hepatocito bajo condiciones en donde esté presente la PCSK9, aumenta la absorción de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-c) por parte del hepatocito, en relación con la absorción de LDL-c por parte de un hepatocito en ausencia de la molécula de enlace de PCSK9.

39. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de enlace de PCSK9 se enlaza con PCSK9 en la presencia de LDL-C.

40. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de enlace de PCSK9 se enlaza con PCSK9 en la presencia de suero.

41. Una molécula de enlace de PCSK9, la cual comprende un dominio de enlace de PCSK9, en donde la secuencia de aminoácidos del dominio de enlace de PCSK9 es cuando menos 75 por ciento idéntica a una secuencia de aminoácidos de un pliegue de tipo inmunoglobulina de una fibronectina, un receptor de citoquina, o una cadherina, y en donde la secuencia de aminoácidos del dominio de enlace de PCSK9 se altera, en relación con la secuencia de aminoácidos del pliegue de tipo inmunoglobulina, de tal manera que el dominio de enlace de PCSK9 se enlaza específicamente con la PCSK9.

219

42. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 41, en donde el dominio de enlace de PCSK9 se enlaza con la PCSK9 con una K_D igual o menor que 10 nM.

43. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 41, en donde el dominio de enlace de PCSK9 se enlaza con la PCSK9 con una K_D igual o menor que 1 nM.

44. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 41, en donde el pliegue de tipo Ig es un pliegue de tipo Ig de una fibronectina.

45. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 44, en donde el pliegue de tipo Ig es un pliegue de tipo Ig de fibronectina tipo III.

46. Una composición farmacéutica, la cual comprende la molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 45.

47. Un método para aumentar los niveles de LDL-R en un hepatocito, comprendiendo el método poner en contacto el hepatocito con una molécula de enlace de PCSK9.

48. Un método para aumentar la absorción de LDL-c por un hepatocito, comprendiendo el método poner en contacto el hepatocito con una molécula de enlace de PCSK9, reduciendo de esta manera la disminución de LDL-R by PCSK9 y aumentando la absorción de LDL-c por parte del hepatocito.

49. Un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos cuando menos 90 por ciento idéntica a una de las

200

siguientes secuencias de aminoácidos:

YRADEYQPPDGG (SEQ ID NO:4);
 TSIQSDHREIEGRVMV (SEQ ID NO:5);
 ENVPEEDGTRFHRQ (SEQ ID NO:6);
 5 AGVVSGRDAGVAKGAS (SEQ ID NO:7);
 VQPVGPL (SEQ ID NO:8);
 VGATNAQDQPVTLG (SEQ ID NO:9);
 IIGASSDCSTCFVSQS (SEQ ID NO:10);
 EAWFPEDQRVLTPN (SEQ ID NO:11);
 10 ALPPSTHGAGWQLFCR (SEQ ID NO:12);
 TVWSAHS GPTRMATAIAR (SEQ ID NO:13);
 CSSFSRSGKRRGERM (SEQ ID NO:14);
 HVLTGCSSHWEVEDLGT (SEQ ID NO:15);
 PVL RPRGQPNQCVG (SEQ ID NO:16);
 15 SALPGTSHVL (SEQ ID NO:17);
 RDVSTTGSTSEEAVTAVAI (SEQ ID NO:18);
 S QSERTARRLQAQ (SEQ ID NO:2); o
 GYLTKILHVFHGLLP GFLVKMSGDLLELA (SEQ ID NO:3).

50. Un método para modular la actividad de PCSK9 en un
 20 sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una molécula
 de enlace de PCSK9 que modula una actividad biológica de la
 PCSK9, en donde la molécula de enlace de PCSK9 exhibe una o más
 de las siguientes actividades:

- (a) inhibir el enlace de PCSK9 con un LDL-R,
- 25 (b) inhibir la actividad proteolítica de la PCSK9,

261

(c) inhibir la disminución de LDL-R dependiente de PCSK9 en un hepatocito, y

(d) inhibir la degradación de LDL-R dependiente de PCSK9 en células de hepatocitos.

5 51. Un método para reducir el colesterol en plasma en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto la composición de la reivindicación 46, en una cantidad efectiva para reducir el colesterol en plasma en el sujeto.

10 52. El método de la reivindicación 51, en donde la cantidad es efectiva para reducir el LDL-c.

 53. El método de la reivindicación 52, en donde la concentración de LDL-c en plasma del sujeto se reduce por cuando menos 5 por ciento, en relación con el LDL-c en plasma antes de administrar la composición.

15 54. El método de la reivindicación 51, en donde el sujeto también está recibiendo terapia con un segundo agente reductor de colesterol.

 55. El método de la reivindicación 54, en donde el segundo agente reductor del colesterol es una estatina.

20 56. El método de la reivindicación 51, en donde el sujeto tiene, o está en riesgo de tener, un trastorno de lípidos.

 57. El método de la reivindicación 56, en donde el sujeto es hipercolesterolémico, o está en riesgo de tener hipercolesterolemia.

25 58. El método de la reivindicación 51, en donde el sujeto tiene, o está en riesgo de tener, aterosclerosis.

262

59. El método de la reivindicación 51, en donde el sujeto tiene, o está en riesgo de tener, un trastorno cardiovascular.

60. El método de la reivindicación 51, en donde el sujeto es intolerante a la estatina.

5 61. El método de la reivindicación 51, en donde el sujeto es resistente a la terapia con estatina.

62. El método de la reivindicación 51, en donde, antes de la administración de la composición, el nivel de colesterol total en plasma del sujeto es de 200 miligramos/decilitro o mayor.

10 63. El método de la reivindicación 51, en donde, antes de la administración de la composición, el nivel de LDL-c en plasma del sujeto es de 160 miligramos/decilitro o mayor.

64. El método de la reivindicación 51, en donde la composición se administra intravenosamente.

15 65. Una molécula de enlace de PCSK9 aislada, la cual comprende una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo que se enlaza específicamente con una PCSK9, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo dentro del pro-dominio de la PCSK9 humana dentro o traslapándose con uno de los
20 siguientes:

(a) aminoácidos 101-107 de la SEQ ID NO: 1; o

(b) aminoácidos 123-132 de la SEQ ID NO: 1.

66. La molécula de enlace de PCSK9 aislada de la reivindicación 65, en donde la porción de enlace de antígeno se
25 enlaza con un epítipo dentro del pro-dominio de la PCSK9 humana

263

dentro o traslapándose con los aminoácidos 101-107 de la SEQ ID NO:1.

67. La molécula de enlace de PCSK9 aislada de la reivindicación 65, en donde la porción de enlace de antígeno se
5 enlaza con un epítipo dentro del pro-dominio de la PCSK9 humana dentro o traslapándose con los aminoácidos 123-132 de la SEQ ID NO:1.

68. Una molécula de enlace de PCSK9 aislada que compite cruzadamente por el enlace con PCSK9, con una molécula de enlace
10 de PCSK9 que se enlaza con un epítipo dentro del pro-dominio de la PCSK9 humana dentro o traslapándose con uno de los siguientes:

(a) aminoácidos 101-107 de la SEQ ID NO: 1; o

(b) aminoácidos 123-132 de la SEQ ID NO: 1.

69. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las
15 reivindicaciones 65 a 67, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo no lineal.

70. La molécula de enlace de PCSK9 de la reivindicación 69, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo no lineal que comprende todos o cuando menos una porción de cada
20 uno de los siguientes epítipos lineales:

(a) aminoácidos 101-107 de la SEQ ID NO:1; y

(b) aminoácidos 123-132 de la SEQ ID NO:1.

71. Una molécula de enlace de PCSK9 aislada, la cual comprende una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo que
25 se enlaza específicamente con una PCSK9, en donde la porción de

264

enlace de antígeno se enlaza dentro de los aminoácidos 101-132 de la SEQ ID NO:1.

72. La molécula de enlace de PCSK9 aislada de la reivindicación 71, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza dentro de los aminoácidos 101-132 de la SEQ ID NO:1 y comprende cuando menos un aminoácido de la SEQ ID NO:2 y cuando menos un aminoácido de la SEQ ID NO:3.

73. Una molécula de enlace de PCSK9 aislada, la cual comprende una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo que se enlaza específicamente con una PCSK9, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo que traslapa cuando menos un aminoácido de la SEQ ID NO:2 y cuando menos un aminoácido de la SEQ ID NO:3.

74. Una molécula de enlace de PCSK9 aislada, la cual comprende una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo que se enlaza específicamente con una PCSK9, en donde la porción de enlace de antígeno se enlaza con un epítipo seleccionado a partir del grupo que consiste en un epítipo dentro de la SEQ ID NO:2, un epítipo dentro de la SEQ ID NO:3, o un epítipo que traslapa cuando menos un aminoácido de la SEQ ID NO:2 y cuando menos un aminoácido de la SEQ ID NO:3.

75. La molécula de enlace de PCSK9 aislada de la reivindicación 73 o 74, en donde el aminoácido de la SEQ ID NO:2 es glutamina.

76. La molécula de enlace de PCSK9 aislada de la

265

reivindicación 73 o 74, en donde la porción de enlace de antígeno traslapa cuando menos dos aminoácidos de la SEQ ID NO:3.

77. La molécula de enlace de PCSK9 aislada de la reivindicación 76, en donde los aminoácidos son glicina y tirosina.

5 78. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones 65 a 67 y 69 a 77, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado, "humanneered", o quimérico.

10 79. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones 65 a 67 y 69 a 77, en donde la porción de enlace de antígeno es una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo monoclonal o policlonal.

80. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones 65 a 77, en donde la molécula de enlace de PCSK9 comprende un fragmento Fab, un Fv de una sola cadena, un
15 fragmento Fab', un F(ab')₂, un diacuerpo, o un fragmento Fv del anticuerpo.

81. La molécula de enlace de PCSK9 de cualquiera de las reivindicaciones 65 a 67 y 69 a 77, en donde la porción de enlace de antígeno se deriva a partir de un anticuerpo de uno de los siguientes
20 isotipos: IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

82. El uso de una molécula de enlace de PSCK9 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para preparar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con altos niveles de colesterol.

RESUMEN

En la presente se describen epítomos de la pro-proteína
convertasa-subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9), composiciones que se
5 enlazan con PCSK9 y con los epítomos de PCSK9, y métodos para
utilizar las composiciones.

* * * * *

10

15

20

25

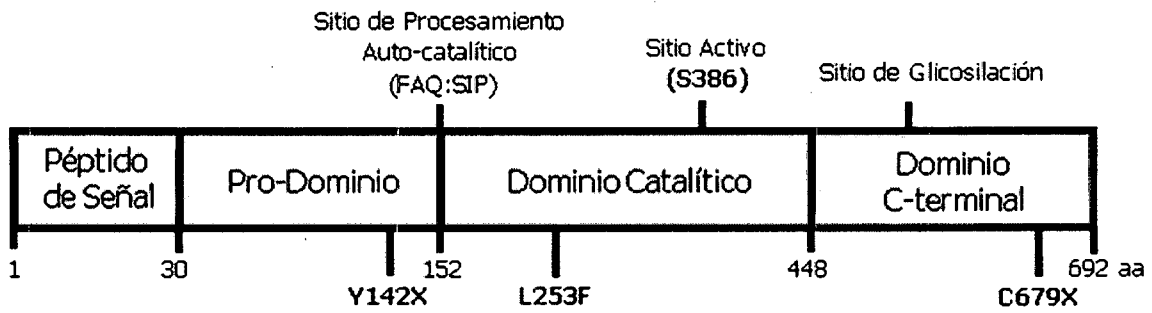


FIG. 1

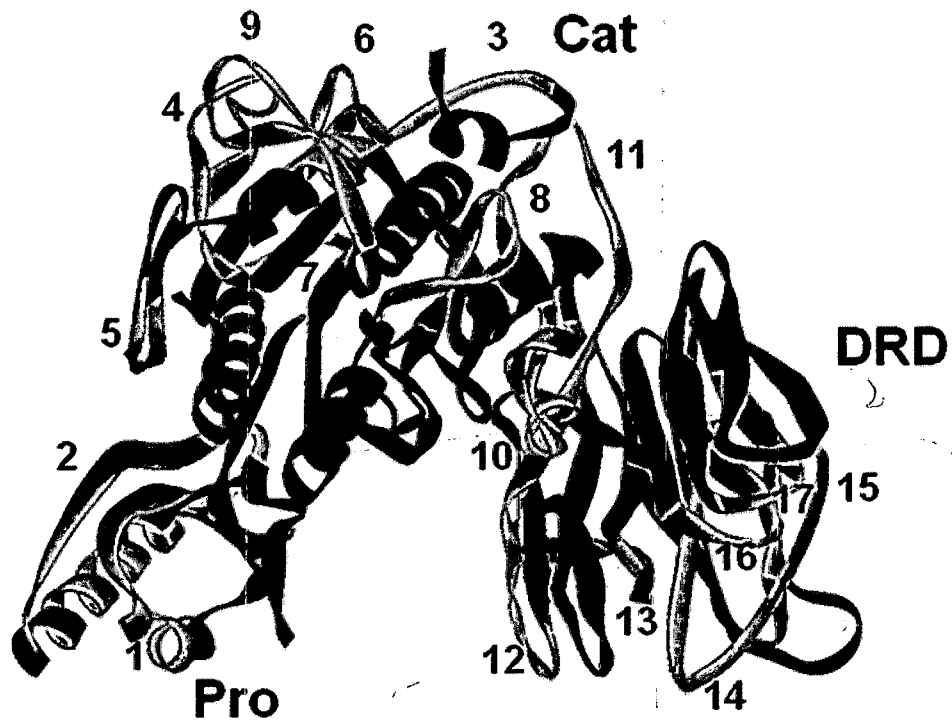


FIG. 2

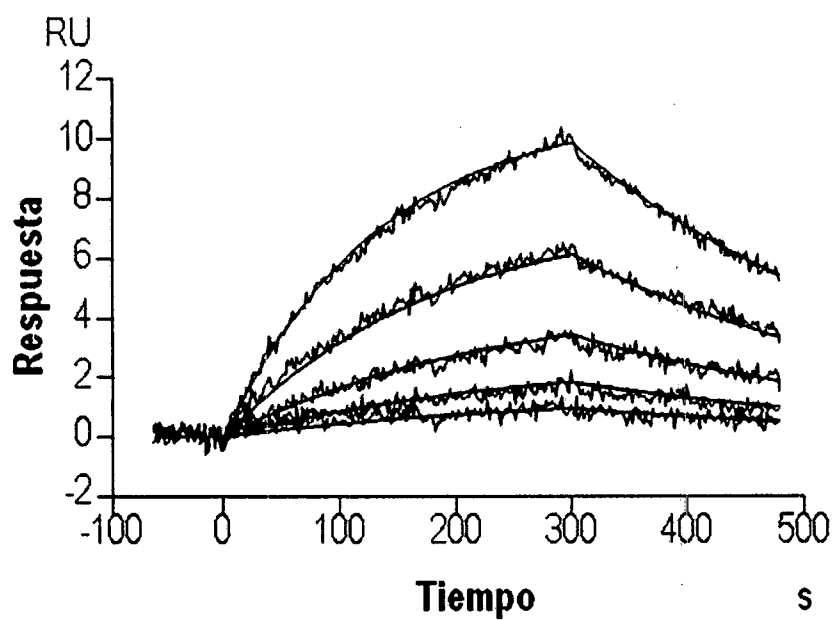


FIG. 3

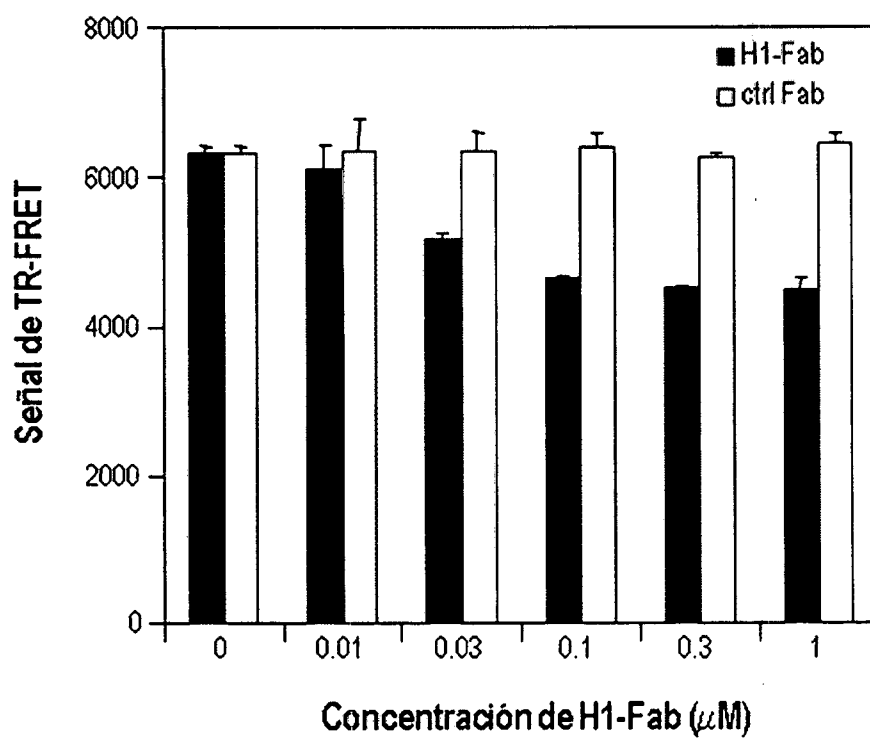


FIG. 4A

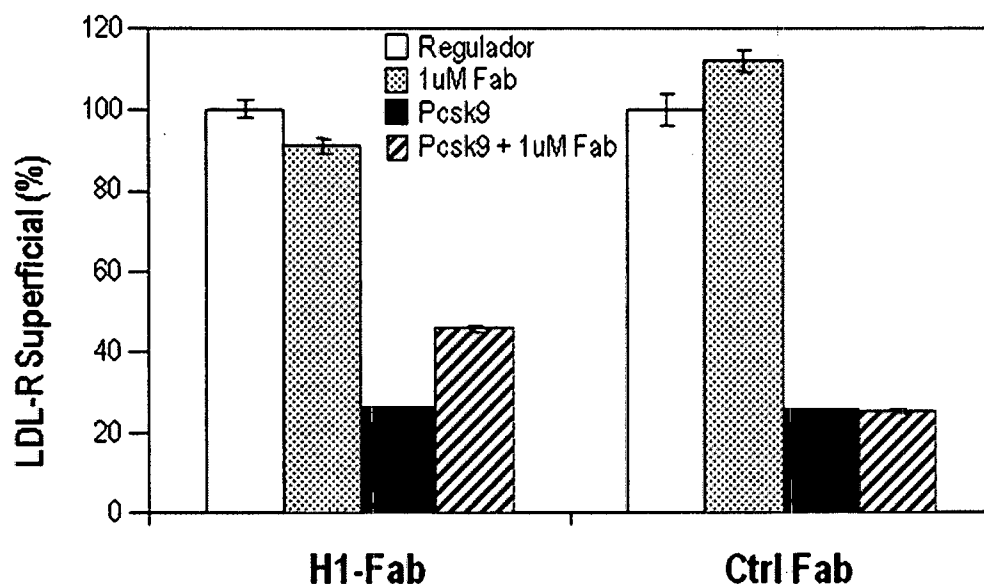


FIG. 4B

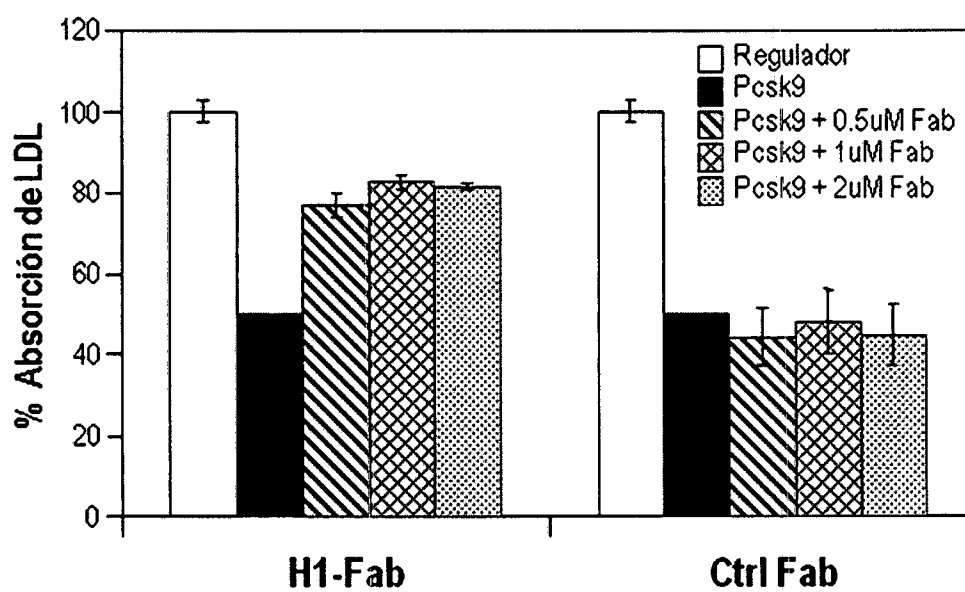


FIG. 4C

ms

FIG. 5A

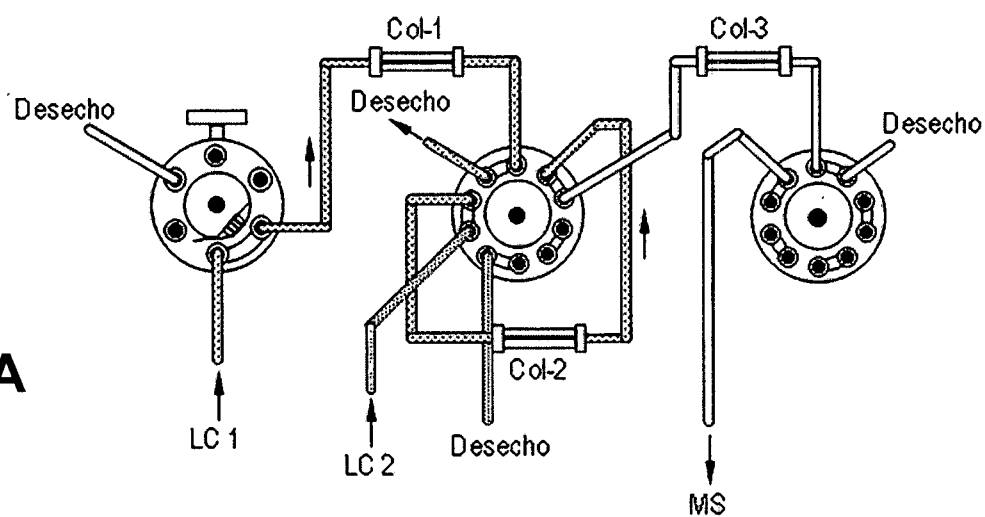


FIG. 5B

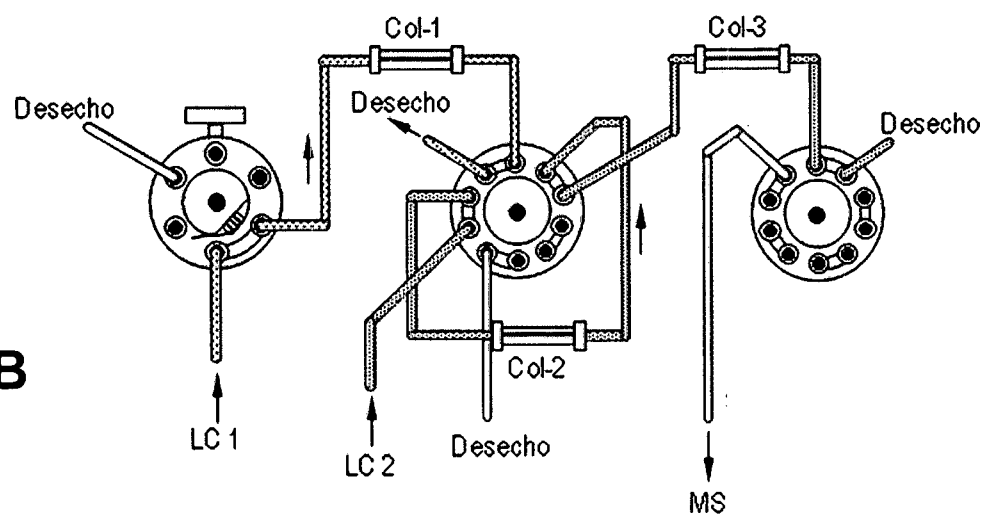
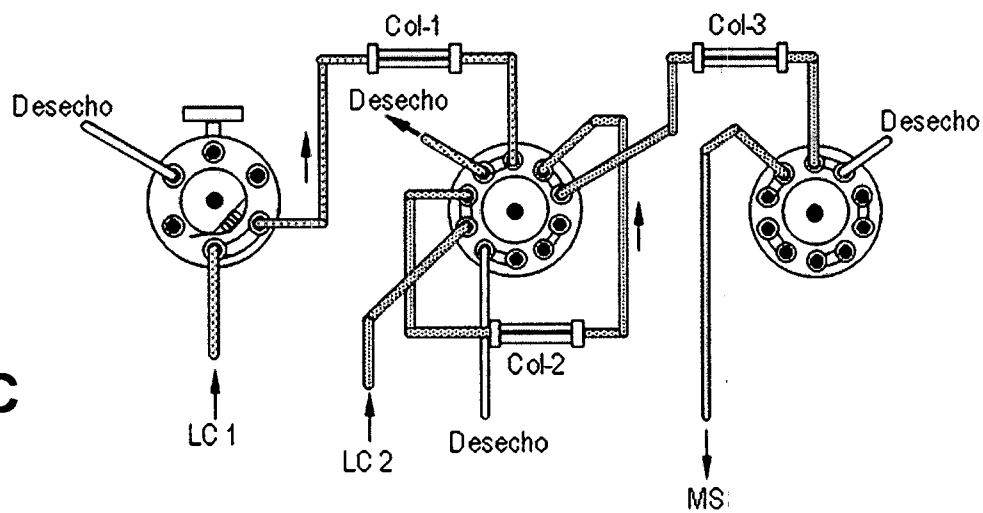
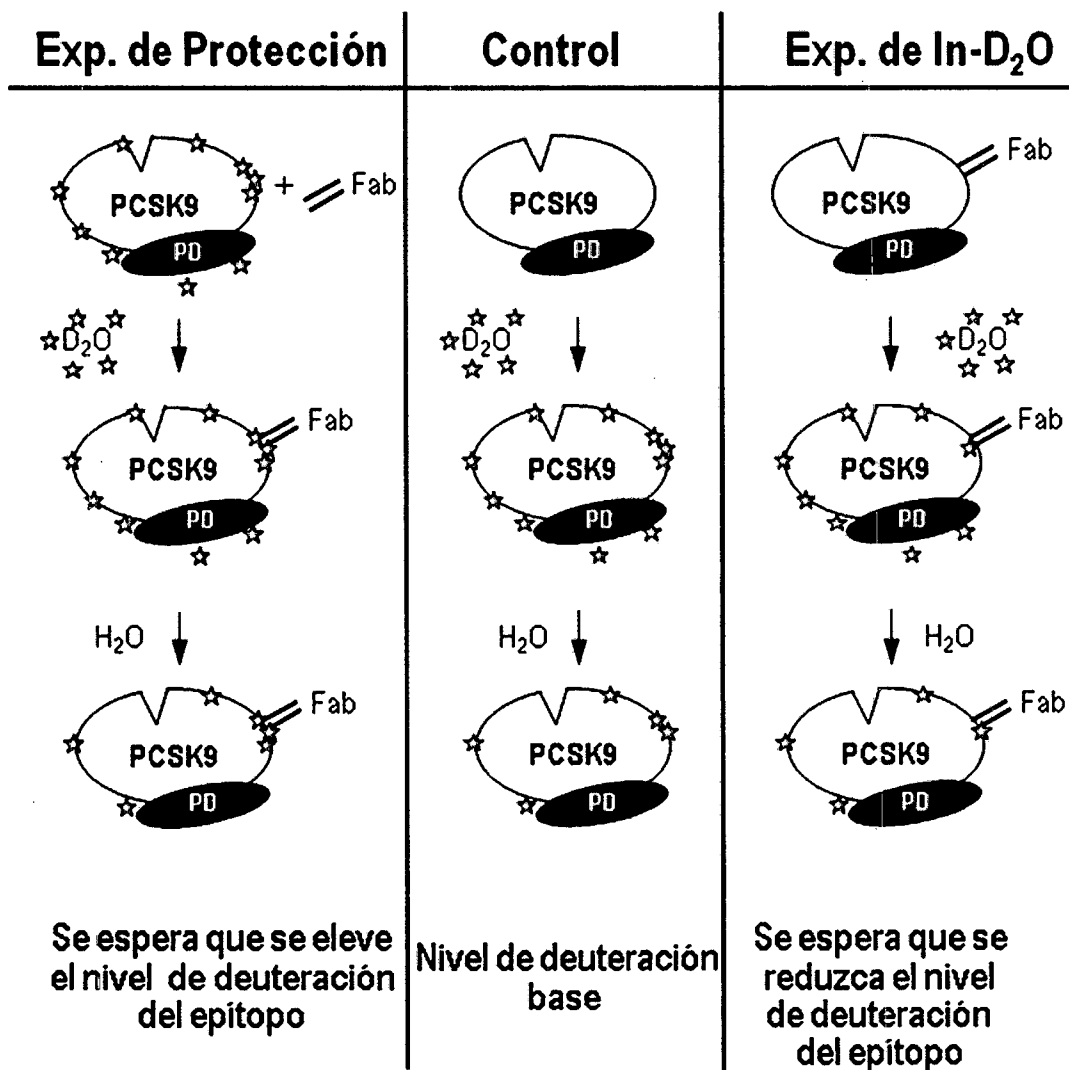


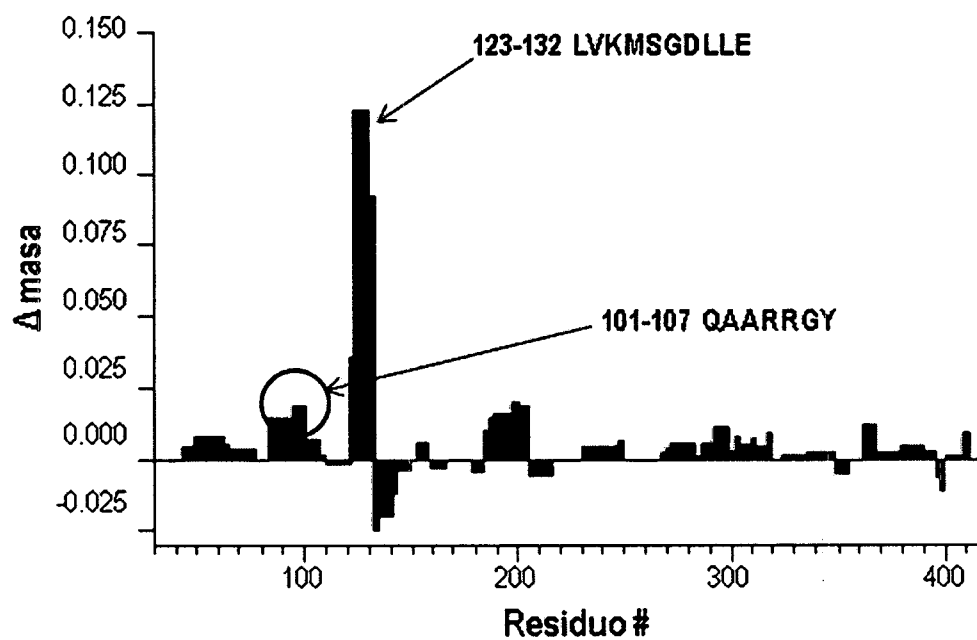
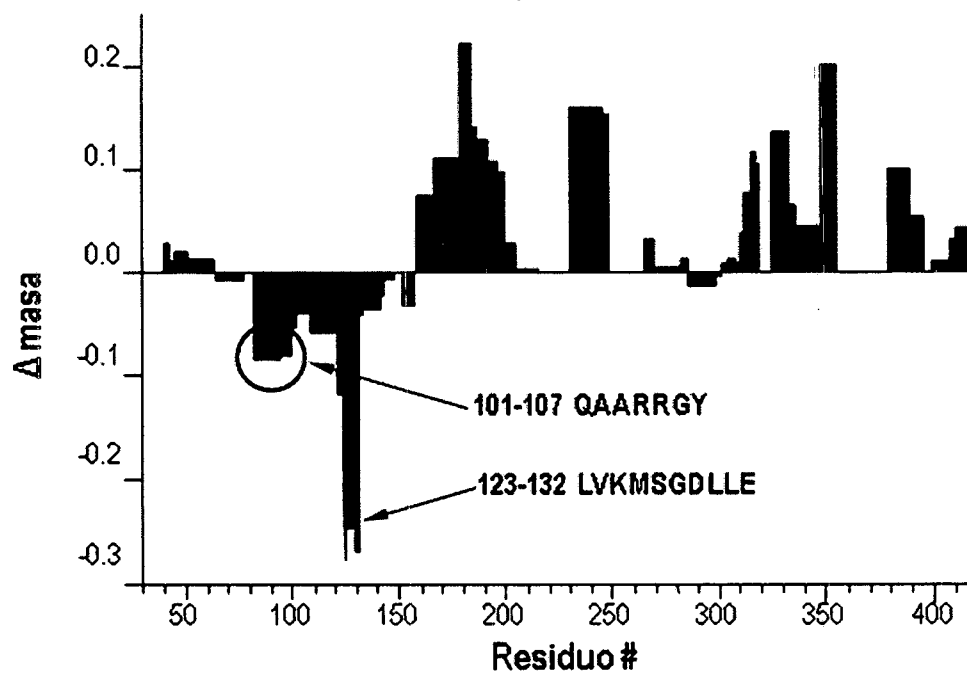
FIG. 5C





Esquema de los experimentos de intercambio complementario de H/D llevados a cabo, y el resultado esperado.

FIG. 6

Cambio de Masa Promedio en el Exp. de Protección de PCSK9/H1-Fab**FIG. 7A****Cambio de Masa Promedio en el Experimento de PCSK9/H1-Fab In-D2O****FIG. 7B**

233

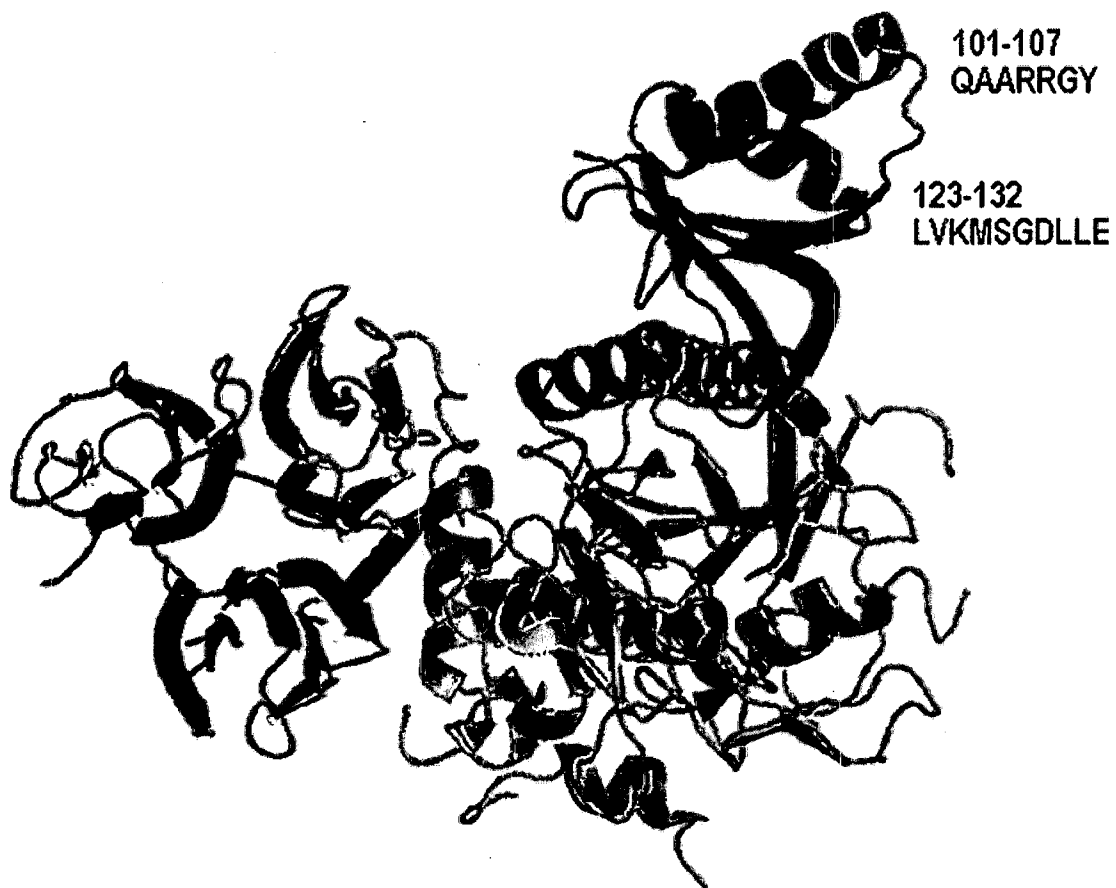


FIG. 8

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 October 2008 (23.10.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/125623 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 16/40 (2006.01) C12N 9/64 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2008/054417

(22) International Filing Date: 11 April 2008 (11.04.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/911,654 13 April 2007 (13.04.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **MIKHAILOV, Dmitri** [US/US]; 305G Winchester Street, Newton, Massachusetts 02461 (US). **YOWE, David Langdon** [US/US]; 34 Fairview Avenue, Belmont, Massachusetts 02478 (US). **FLEMING, Tony** [US/US]; 152 Hudson Road, Stow, Massachusetts 01775 (US).

(74) Agent: **VOEGELI-LANGE, Regina**; Novartis Pharma AG, Patent Department, CH-4002 Basel (CH).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

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

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

Declaration under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

Published:

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

(88) Date of publication of the international search report:
5 February 2009

WO 2008/125623 A3

(54) Title: MOLECULES AND METHODS FOR MODULATING PROPROTEIN CONVERTASE SUBTILISIN/KEXIN TYPE 9 (PCSK9)

(57) Abstract: Epitopes of Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), compositions that bind to PCSK9 and PCSK9 epitopes, and methods of using the compositions are described herein.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/054417

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/40 C12N9/64

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K C12N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LAGACE THOMAS A ET AL: "Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 116, no. 11, November 2006 (2006-11), pages 2995-3005, XP002493243 ISSN: 0021-9738 * the whole document, in particular page 2996 left column last 3 lines, page 3003 left column lines 28-31 and lines 39-41* ----- -/--	1,4-7,9, 13, 17-40, 46-64,82

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August 2008

Date of mailing of the international search report

09/12/2008

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Sommerfeld, Teresa

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/054417

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RASHID S ET AL: "Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, vol. 102, no. 15, 12 April 2005 (2005-04-12), pages 5374-5379, XP002478031 ISSN: 0027-8424 *the whole document, in particular page 5375 left column lines 16-17, page 5378 right column lines 9-12 and page 5379 right column last 2 lines*	1,4-7,9, 13, 17-40, 46-64,82
Y	MAXWELL KARA N ET AL: "Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 101, no. 18, 4 May 2004 (2004-05-04), pages 7100-7105, XP002493244 ISSN: 0027-8424 the whole document	1,4-7,9, 13, 17-40, 46-64,82
Y	WO 01/57081 A (MILLENNIUM PHARM INC [US]; CHIANG LILLIAN WEI MING [US]) 9 August 2001 (2001-08-09) *the whole document, in particular Figure 2*	1,4-7,9, 13, 17-40, 46-64,82
A	HORTON ET AL: "Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARDS, GB, vol. 32, no. 2, 6 February 2007 (2007-02-06), pages 71-77, XP005876225 ISSN: 0968-0004	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/054417

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

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

see annex

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1,4-7,9,13,17-40,46-64,82 all partially

PCSK9 binding molecule which binds epitope within or overlapping amino acids 166-177 of Seq.ID. No. 1 (Seq.ID. No. 4), and related subject-matter

2. claims: 1,4-7,10,13,17-40,46-64,82 all partially

PCSK9 binding molecule which binds epitope within or overlapping amino acids 187-202 of Seq.ID. No. 1 (Seq.ID. No. 5), and related subject-matter

3. claims: 1,4-7,11,13,17-40,46-64,82 all partially

PCSK9 binding molecule which binds epitope within or overlapping amino acids 206-219 of Seq.ID. No. 1 (Seq.ID. No. 6), and related subject-matter

4. claims: 1,4-7,10,13,17-40,46-64,82 all partially

PCSK9 binding molecule which binds epitope within or overlapping amino acids 231-246 of Seq.ID. No. 1 (Seq.ID. No. 7), and related subject-matter

5. claims: 1,4-7,11,13,17-40,46-64,82 all partially

PCSK9 binding molecule which binds epitope within or overlapping amino acids 277-283 of Seq.ID. No. 1 (Seq.ID. No. 8), and related subject-matter

6. claims: 1,4-7,12,13,17-40,46-64,82 all partially

PCSK9 binding molecule which binds epitope within or overlapping amino acids 336-349 of Seq.ID. No. 1 (Seq.ID. No. 9), and related subject-matter

7. claims: 1,4-7,10,13,17-40,46-64,82 all partially

PCSK9 binding molecule which binds epitope within or overlapping amino acids 368-383 of Seq.ID. No. 1 (Seq.ID. No. 10), and related subject-matter

8. claims: 1,4-7,12,13,17-40,46-64,82 all partially

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

PCSK9 binding molecule which binds epitope within or overlapping amino acids 426-439 of Seq.ID. No. 1 (Seq.ID. No. 11), and related subject-matter

9. claims: 1,4-7,9,13,17-40,46-64,82 all partially

PCSK9 binding molecule which binds epitope within or overlapping amino acids 443-500 of Seq.ID. No. 1, and related subject-matter

10. claims: 1,4-7,13-15,17-40,46-64,82 all partially

PCSK9 binding molecule which binds epitope within or overlapping amino acids 557-590 of Seq.ID. No. 1, and related subject-matter

11. claims: 1,4-7,13-15,17-40,46-64,82 all partially

PCSK9 binding molecule which binds epitope within or overlapping amino acids 636-678 of Seq.ID. No. 1, and related subject-matter

12. claims: 3-8,13,17-40,46-64,82 all partially; 16 and 65-81 completely

PCSK9 binding molecule which binds epitope within or overlapping amino acids 89-134 of Seq.ID. No. 1, and related subject-matter

13. claims: 41-45 (completely), 46-48,50-64,82 all partially

PCSK9 binding molecule wherein the amino acid sequence of the PCSK9 binding domain is at least 75% identical to an amino acid sequence of an immunoglobulin-like fold of a fibronectin, a cytokine receptor, or a cadherin, and which is altered so as to specifically bind PCSK9, and related subject-matter

14. claims: 47,48, 50 and 82 (all partially)

PCSK9 binding molecule and related subject-matter

Information on patent family members

280

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la invención []
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA ☒

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA ☒

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-112535- -00000-0000

Fecha: 2009-10-09 16:42:06 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 280

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10'

Conmutador: 3 82 0840

Fax: 3505220

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá D.C. - Colombia



Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
NOVARTIS AG

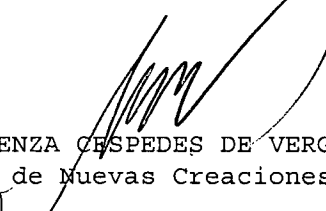
REFERENCIA	Radicación No.	9 112535
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/054417
	Fecha inicio fase nacional	13/11/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	12514

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha **13 NOV. 2009**
adpall

Al contestar favor indique el número
de radicación consignado en el rótulo

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia



Bogotá,
2020

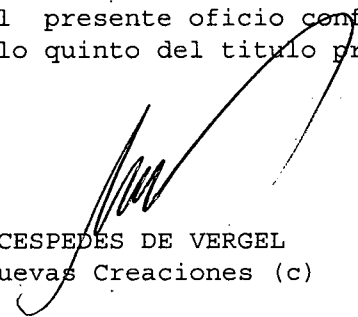
Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
NOVARTIS AG

REFERENCIA	Radicación No.	9 112535
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/054417
	Fecha inicio fase nacional	13/11/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	12515

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 13 NOV. 2009
adpall