Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Radicación	15 301138 0000 0000	2015-12-18 15:46:56	
Trámite	11	PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	
Evento	378	FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I	
Actuación	411	PRESENTACION	Folios: 591
Dependencia	2020	DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	
Pago #1	137158	$ 503500	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	**Titulo de la Invención** (200 caractares o espacios máximos)
	ANTICUERPOS DEL RECEPTOR 1 DE LDL OXIDADO SIMILAR A LECTINA Y MÉTODOS DE USO.

2	**Datos del Solicitante / Titular**			
	Nombre:	NOVARTIS AG	**Dirección Electrónica:**	patents@olartemoure.com
	Dirección:	Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel	**Domicilio/País de constitución:**	SUIZA - BASEL - BASEL

Identificación:

- ☐ CEDULA DE CIUDADANIA
- ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
- ☒ EMPRESA EXTRANJERA
- ☐ NIT
- ☐ PASAPORTE

Número: 1022362127-

3	**Solicitantes**		
	Apellidos - Nombres o Razón Social	**Tipo**	**Identificación**
1.	NOVARTIS AG	NN	1022362127

4	**Datos del Inventor**			
	Nombre:	Kurt Alex HELDWEIN	**Dirección Electrónica:**	patents@olartemoure.com

Dirección:	100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139	**Domicilio/País de constitución:**	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - MASSACHUSETTS - CAMBRIDGE

Identificación:

☐ CEDULA DE CIUDADANIA	☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA	☐ NIT
☐ PASAPORTE	☒ No Aplica

Número: -

5 Inventor(es)

	Apellidos - Nombres	Domicilio
1.	HELDWEIN Kurt Alex	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
2.	SPLAWSKI Igor	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
3.	BROGDON Jennifer	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
4.	GOLDSTEIN Joshua	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
5.	DOLE William	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
6.	TRAUGER John	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
7.	ZHANG Chonghui	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

6 Datos Inventor(es)

	País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	CAMBRIDGE	100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	CAMBRIDGE	100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139

3.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	CAMBRIDGE	250 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	CALIFORNIA	SAN DIEGO	10675 John Jay Hopkins Drive, San Diego, California 92121
5.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	CAMBRIDGE	220 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139
6.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	CAMBRIDGE	100 Technology Square, Cambridge, Massachusett 02139
7.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	CAMBRIDGE	300 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139

7	**Datos del Representante Legal / Apoderado**		
Nombre:	CARLOS R. OLARTE GARCIA	**Dirección Electrónica:**	patents@olartemoure.com
Dirección:	Cra. 5ta No. 34-03	**Domicilio/País de constitución:**	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.

Identificación:

☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA

☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT

☐ PASAPORTE

Número: 79782747-

Presentación de Poder

Año de Radicación	
Número de Radicación	

8	**Datos Solicitud: PCT / WO**		
Número Solicitud:	PCT/US2014/043315	**Fecha Solicitud:**	20/06/2014

Número Publicacion:	WO2014/205300	**Fecha Publicacion:**	24/12/2014

9	**Declaraciones de prioridad**	☒ SI ☐ NO

	(33) País de origen	Codigo del país	(31) No. Solicitud	(32) Fecha _
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	US	61/837,776	21/06/2013

10	**Reivindicaciones**			
Número reivindicaciones:	27	**Pago Reivindicaciones:**	No	

11 Reducción de tasas.

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolucón vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

☐ Micro, pequeñas y medianas empresas
☐ Universidades públicas o privadas
☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12 Documentos Anexos

☒ Reivindicaciones
☒ Descripción
☒ Dibujos y/o Figuras
☒ Resumen
☐ Certificado Depósito Material Biológico
☐ Uso de Conocimiento tradicional
☒ Listado de secuencias
☐ Artes finales 12 x 12 cm
☒ Poderes, si fuere el caso
☒ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
☒ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
☒ Otros Anexos

ANTICUERPOS DEL RECEPTOR 1 DE LDL OXIDADO SIMILAR A LECTINA Y MÉTODOS DE USO

FUDAMENTO DE LA INVENCIÓN

La enfermedad vascular sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La identificación de los factores de riesgo de los fármacos disminuye en parte el riesgo vascular. Sin embargo, datos experimentales y clínicos sugieren que otros factores novedosos pueden explicar la mayor parte del riesgo para las enfermedades arteriales coronarias, cerebrales y periféricas y sus manifestaciones clínicas.

La recaptación no regulada de las partículas oxidativamente modificadas (oxLDL) de lipoproteína de baja densidad (LDL) por las células vasculares mediada por receptores no específicos se considera que es un paso crucial en la aterogénesis. Además de la mediación de la absorción de lípidos oxidados, los receptores no específicos pueden mediar la activación de vías de señalización pro-oxidantes y pro-inflamatorias que están implicados en la activación de las células endoteliales y los macrófagos, y que conducen a la progresión de la aterosclerosis y la erosión/ ruptura de placas, así como a la disfunción microvascular con la perfusión tisular alterada y liberación / utilización de de oxígeno, lo que resulta en infarto o isquemia de miembros inferiores.

El receptor 1 de la lipoproteína de baja densidad oxidado similar a lectina (LOX-1) es un receptor no específico multifuncional que se expresa en las células vasculares endoteliales, monocitos y macrófagos, células del músculo liso vascular y las plaquetas. LOX-1 se une a oxLDL y otros lípidos oxidados, dando como resultado la activación de la NADPH oxidasa y la generación de especies de oxígeno reactivas, incluyendo el anión superóxido. El anión superóxido inactiva el óxido nítrico endotelial y activa la MAP quinasa y NF-kB. Esto a su vez induce la expresión de moléculas de adhesión inflamatorias, citocinas y quimiocinas, así como metaloproteinasas de matriz y mediadores pro-apoptóticos.

Las consecuencias pro-inflamatorias, pro-oxidantes y pro-apoptóticas de señalización mediada por oxLDL - LOX-1 en células endoteliales, células de músculo liso y macrófagos se cree que desempeñan un papel clave en la progresión de la aterosclerosis y la inestabilidad de placas y también pueden desempeñar un papel en la

perfusión tisular y entrega de oxígeno no uniformes, que resultan en isquemia. Las consecuencias clínicas de la aterosclerosis avanzada y la isquemia de órganos incluyen: síndromes coronarios agudos, infarto de miocardio, angina inestable, accidente cerebrovascular, angina de pecho, claudicación e isquemia crítica de las extremidades. Además, el estrés oxidativo, la inflamación vascular y la resultante disfunción microvascular se cree que contribuyen a la enfermedad vascular diabética, incluyendo la nefropatía y retinopatía.

Mientras que los niveles de expresión de LOX-1 endotelial basal son relativamente bajos en condiciones fisiológicas normales, la expresión de LOX-1 vascular está regulada positivamente en condiciones asociadas con la enfermedad vascular. Se ha demostrado que los niveles de LOX-1 endotelial son aumentados por el estrés oxidativo, citoquinas proinflamatorias, proteína C-reactiva (CRP) y angiotensina II. LOX-1 también está regulado positivamente en el endotelio de animales ateroscleróticos y diabéticos y en monocitos / macrófagos aislados de pacientes con enfermedad vascular. La hiperglucemia, productos finales glicosilados avanzados y las lipoproteínas aterogénicas también regulan de manera positiva la expresión de LOX-1, proporcionando una relación mecanicista molecular específica entre la diabetes y las complicaciones vasculares.

La regulación positiva de LOX-1 por las citocinas y la PCR también sugiere una relación entre los factores de riesgo vascular convencional y la enfermedad vascular acelerada en pacientes de alto riesgo y diabéticos. Tanto PCR como LOX-1 soluble se encuentran elevados en pacientes con síndromes coronarios agudos. Los datos in vitro han demostrado que los anticuerpos anti-LOX-1 previenen la adhesión de monocitos mediada por CRP a células endoteliales aórticas humanas, soportando además un papel para LOX-1 como una molécula de adhesión relevante para la inflamación vascular (Li, Circulation Research 2004, 95 : 877-883).

El aumento de expresión de LOX-1 acoplado a niveles elevados de oxLDL y de otras lipoproteínas oxidadas induce la disfunción endotelial, en parte, mediante la activación de la NADPH oxidasa y la generación de especies reactivas de oxígeno. Experimentalmente, la disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo se puede revertir con un anticuerpo anti-LOX-1 neutralizante en ratones ApoE *Knockout* (Xu, Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology 2007, 27:871-877). En este estudio, el anticuerpo anti-LOX-1 aumentó tanto el óxido nítrico biodisponible como la expresión de proteína eNOS.

Datos experimentales in vivo indican que la sobreexpresión de LOX-1 vascular y de macrófagos en presencia de lípidos oxidados contribuye a la aterosclerosis y la disfunción microvascular mediante la activación de vías de señalización pro-oxidantes y pro-inflamatorias. Por lo tanto, se espera que la inhibición de lLOX-1 evite el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis y sus complicaciones agudas tales como síndromes coronarios agudos, infarto de miocardio y angina inestable. Además también se espera que la inhibición de LOX-1 mejore la disfunción microvascular, previniendo las manifestaciones clínicas de isquemia tisular tales como angina de pecho crónica, angina de pecho refractaria, claudicación e isquemia crítica de las extremidades.

La inhibición de LOX-1 es útil no sólo en el tratamiento y la prevención de la enfermedad vascular aterosclerótica, sino también en el tratamiento de otras condiciones patológicas caracterizadas por estrés oxidativo e inflamación, como la artritis reumatoide, varias formas de vasculitis, uveítis, degeneración macular relacionada con la edad, y prevención de eventos cardiovasculares en enfermedades autoinmunes (por ejemplo lupus eritematoso, psoriasis).

En resumen, los datos experimentales y clínicos sugieren que LOX-1 puede ser el receptor de lípido oxidado crítico que une el estrés oxidativo, la inflamación y la enfermedad vascular. Los anticuerpos anti-LOX-1 y fragmentos de unión a antígeno descritos en esta invención inhiben la unión de oxLDL y de otros lípidos/ lipoproteínas oxidados de LOX-1, evitando la activación de LOX-1, reduciendo así el estrés oxidativo vascular y la inflamación. Se espera que estos anticuerpos eviten y alivien las manifestaciones agudas y crónicas de la enfermedad vascular y eviten y mejoren otras enfermedades caracterizadas por el estrés oxidativo y la inflamación.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen al receptor 1 de LDL (lipoproteína de baja densidad) oxidado similar a lectina humana (en lo sucesivo, denominado a veces como "LOX-1"), y composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento que comprenden los mismos.

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados, o fragmentos de unión a antígeno, que se describen en el presente documento se unen a LOX-1, con una constante de disociación de equilibrio (KD) de menos o igual a 100 pM. Por ejemplo, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno que se describen en este documento pueden unirse a

LOX-1 humano con una Kd inferior o igual a 100 pM, inferior o igual a 50 pM, inferior o igual a 45 pM, inferior o igual a 40 pM, inferior o igual a 35 pM. Más específicamente, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno descritos en este documento también pueden unirse a LOX-1 humano con una K_D inferior o igual a 34 pM, medida por Biacore, o inferior o igual a 4 pM, tal como se mide por el ensayo de valoración con una solución de equilibrio (SET); y también puede unirse a LOX-1 de mono cinomolgus con una K_D inferior o igual a 53 pM, medida por Biacore, o inferior o igual a 4 pM, tal como se mide por SET.

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se une a LOX-1 humano y de mono cynomolgus. La invención también se refiere a un anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se une al dominio tipo lectina C-terminal de LOX-1 (dominio de unión a oxLDL). La invención también se refiere a un anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se une a un epítopo que comprende los residuos de aminoácidos 228 a 246 de LOX-1 humano (FRVRGAVSQTYPSGTCAYI; SEC ID No: 3). La presente invención también incluye un anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se une a un epítopo en LOX-1 humano que comprende los residuos de aminoácidos Arg229 y Arg231 de LOX-1 humano (SEC ID No: 1).

La presente invención también se refiere a un anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se une a LOX-1 y compite adicionalmente por la unión con un anticuerpo como se describe en la Tabla 1. La presente invención también se refiere además a un anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se une al mismo epítopo que un anticuerpo como se describe en la Tabla 1.

La afinidad de unión de los anticuerpos aislados y fragmentos de unión a antígeno descritos en este documento se puede determinar por valoración con una solución de equilibrio (SET). Los métodos para SET son conocidos en la técnica y se describen con más detalle a continuación. Alternativamente, la afinidad de unión de los anticuerpos aislados, o fragmentos, descritos en el presente documento se puede determinar mediante el ensayo de Biacore. Métodos para ensayos cinéticos Biacore son conocidos en la técnica y se describen en más detalle a continuación.

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados y fragmentos de de unión a antígeno descritos en este documento pueden usarse para inhibir la unión de LOX-1 a oxLDL (también conocido como LDL modificada).

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados y fragmentos de unión a antígeno descritos en este documento pueden usarse para inhibir la unión de LOX-1 a múltiples formas de LDL modificada (lipoproteínas de baja densidad) con una IC50 inferior o igual a 100 nM, inferior o igual a 50 nM, inferior o igual a 35 nM, inferior o igual a 25 nM, inferior o igual a 10 nM, o inferior o igual a 5,2 nM. Más específicamente, un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente puede inhibir la unión de LOX-1 a LDL modificada de manera oxidativa con sulfato de cobre (ox-LDLs) con una IC_{50} inferior o igual a 100 nM, inferior o igual a 50 nM, inferior o igual a 35 nM, inferior o igual a 25 nM, inferior o igual a 10 nM, o inferior o igual a 5,2 nM. Más específicamente, un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente puede inhibir la unión de LOX-1 a LDL modificada por malondialdehido con una IC_{50} inferior o igual a 100 nM, inferior o igual a 50 nM, inferior o igual a 35 nM, inferior o igual a 25 nM, inferior o igual a 20 nM, o inferior o igual a 18 nM. Más específicamente, un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente puede inhibir la unión de LOX-1 a LDL modificada con hipoclorito con una IC_{50} inferior o igual a 100 nM, inferior o igual a 50 nM, inferior o igual a 35 nM, inferior o igual a 25 nM, inferior o igual a 10 nM, o inferior o igual a 5 nM.

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se pueden usar para reducir la expresión de LOX-1 y/o NADPH oxidasa (NADPH es la forma reducida de NADP, o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato).

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden usarse para inhibir (por ejemplo, bloquear la inducción de) el estrés oxidativo, por ejemplo, a través de inhibir la unión de oxLDLs a LOX-1. Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden ser usados para bloquear la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) estimuladas con oxLDL. El estrés oxidativo vascular, que los anticuerpos aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden usar para prevenir, tratar, o mejorar, causa isquemia de

miocardio al inducir vasoconstricción, alterar la vasodilatación y aumentar la demanda de oxígeno.

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se pueden usar para restaurar los niveles de sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) a un estado saludable, homeostático. NOS endotelial es una sintasa de óxido nítrico que genera óxido nítrico (NO) en los vasos sanguíneos y está implicado en la regulación del tono vascular mediante la inhibición de la contracción del músculo liso y la agregación plaquetaria; su regulación a la baja se asocia con la disfunción celular endotelial relacionada con LOX-1.

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, como se describe en el presente documento pueden ser anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos o humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos Fv, fragmentos F(ab')2, o fragmentos scFv, y/o isotipos de IgG.

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, como se describe en el presente documento incluyen una estructura marco en la cual un aminoácido ha sido sustituido en la estructura de anticuerpo a partir de las respectivas secuencias de la línea germinal humana VH o VL.

Otro aspecto de la invención incluye un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que tiene secuencias de cadena pesada y ligera total de Fabs descritas en la Tabla 1. Más específicamente, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión al antígeno de los mismos puede tener secuencias de cadena pesada y ligera de Fab FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6.

Un aspecto adicional de la invención incluye un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que tiene secuencias de de dominio variable de cadena pesada y ligera de las Fabs descritas en la Tabla 1. Más específicamente, el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de los mismos pueden tener la secuencia de dominio variable de cadena pesada y ligera de Fab FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6.

La invención también se relaciona con un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que incluye además una CDR1 de cadena pesada seleccionada del

grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 8, 28, 48, y 68, y 88, una CDR2 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, y 89; una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 10, 30, 50, 70, y 90, en el que el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo se une a LOX-1 humano. En otro aspecto, tal anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno de los mismo incluye además una CDR1 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 18, 38, 58, y 78, y 98, una CDR2 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, y 99; una CDR3 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, y 100.

La invención también se relaciona con un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluye además una CDR1 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 18, 38, 58, y 78, y 98, una CDR2 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, y 99; una CDR3 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, y 100, en el que el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo se une a LOX-1 humano.

La invención también se refiere a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que se une a LOX-1 que tiene HCDR1, HCDR2, y HCDR3 y LCDR1, LCDR2, y LCDR3, en donde HCDR1, HCDR2, y HCDR3 comprende SEQ ID NOs: 8, 9, y 10, y LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprende SEQ ID NOs: 18, 19, y 20; o HCDR1, HCDR2, y HCDR3 comprende SEQ ID NOs: 28, 29, y 30, y LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprende SEQ ID NOs: 38, 39, y 40; o HCDR1, HCDR2, y HCDR3 comprende SEQ ID NOs: 48, 49, y 50, y LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprende SEQ ID NOs: 58, 59, y 60; o HCDR1, HCDR2, y HCDR3 comprende SEQ ID NOs: 68, 69, y 70, y LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprende SEQ ID NOs: 78, 79, y 80; o HCDR1, HCDR2, y HCDR3 comprende SEQ ID NOs: 88, 89, y 90, y LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprende SEQ ID NOs: 98, 99, y 100.

La invención también se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que tiene HCDR1, HCDR2, HCDR3 de la cadena pesada variable de SEC ID No: 14, 34, 54, 74, o 94 y la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de la cadena ligera variable de SEQ ID NO: 24, 44, 64, 84, o 104, como se define por Chothia. En otro aspecto de la invención, el

anticuerpo o fragmento de unión a antígeno pueden tener la HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de la secuencia del dominio variable de cadena pesada de la SEC ID Nos: 14, 34, 54, 74, o 94 y la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, o 104, como se define por Kabat.

En un aspecto de la invención, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo incluye una secuencia de dominio variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No: 14, 34, 54, 74, y 94. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno pueden además comprender una secuencia de dominio variable de cadena ligera en la que el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera se combinan para formar un sitio de unión a antígeno para LOX-1. En particular, la secuencia del dominio variable de cadena ligera puede seleccionarse de las SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, y 104, en el que dicho anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo se une a LOX-1.

La invención también se relaciona con un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluye una secuencia de dominio variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, y 104, en el que dicho anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo se une a LOX-1 humana. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno pueden comprender además una secuencia de dominio variable de cadena pesada en la que el dominio variable de cadena ligera y dominio variable de cadena pesada se combinan para formar un sitio de unión a antígeno para LOX-1.

En particular, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a LOX-1, puede tener dominios variables de cadena pesada y ligera que comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 14 y 24; 34 y 44; 54 y 64; 74 y 84; o 94 y 104, respectivamente.

La invención también se relaciona con un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluye un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74, y 94, en el que dicho anticuerpo se une a LOX-1. En un aspecto, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo también incluye un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de

identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, y 104. En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno tiene una HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se define por Kabat y como se describe en la Tabla 1.

La invención también se relaciona con un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluye un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, y 104, en donde dicho anticuerpo se une a LOX-1.

En otro aspecto de la invención, el anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se une a LOX-1 puede tener una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16, 36, 56, 76, o 96. El anticuerpo aislado también puede incluir una cadena ligera que puede combinarse con la cadena pesada para formar un sitio de unión a antígeno de LOX-1 humana. En particular, la cadena ligera puede tener una secuencia que comprende la SEC ID No: 26, 46, 66,86, o 106. En particular, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que se une a LOX-, puede tener una cadena pesada y una cadena ligera que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 16 y 26; 36 y 46; 56 y 66; 76 y 86; o 96 y 106, respectivamente.

La invención también se relaciona con un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluye una cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 16, 36, 56, 76, y 96, en el que dicho anticuerpo se une a LOX-1. En un aspecto, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo también incluye una cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 26, 46, 66, 86 or 106.

La invención también se relaciona con un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluye una cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 26, 46, 66, 86, o 106, en donde dicho anticuerpo se une a LOX-1.

La invención también se refiere a composiciones que comprenden el anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente

documento. Además, composiciones de anticuerpos en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Específicamente, la invención incluye además composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno del mismo de la Tabla 1, tales como, por ejemplo anticuerpo FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación de dos o más de los anticuerpos aislados o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la Tabla 1.

La invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada variable que tiene una secuencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, y 94. En particular, el ácido nucleico tiene una secuencia de al menos 90% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 15, 35, 55, 75 y 95. En un aspecto adicional de la invención, la secuencia es SEQ ID NOs: 15, 35, 55, 75, y 95.

La invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la cadena ligera variable que tiene una secuencia seleccionada entre las SEQ ID No: 25, 45, 65, 85, y 105. En particular, el ácido nucleico tiene una secuencia de al menos 90% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 25, 45, 65, 85 y 105. En un aspecto adicional de la invención, la secuencia es SEQ ID NOs: 25, 45, 65, 85, y 105.

La invención también se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que incluye un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 25, 45, 65, 85, y 105.

La invención también se refiere a un vector que incluye una o más de las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento.

La invención también se refiere a una célula huésped aislada que incluye una secuencia de ADN recombinante que codifica una cadena pesada del anticuerpo descrito anteriormente, y una segunda secuencia de ADN recombinante que codifica una cadena ligera del anticuerpo descrito anteriormente, en el que dichas secuencias de ADN están unidas operativamente a un promotor y son capaces de ser expresadas en la célula

huésped. Se contempla que el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humano. También se contempla que la célula huésped es una célula de mamífero no humano.

La invención también se refiere a un método de reducción de expresión de LOX-1, y/o expresión de NADPH oxidasa, en el que el método incluye la etapa de poner en contacto una célula con una cantidad eficaz de una composición que comprende el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo descritos en este documento.

La invención también se refiere a un método de inhibición de la unión de la LDL oxidada (oxLDL) a un receptor de LDL humano oxidado (LOX-1) o inhibir la incorporación mediada por el receptor de LDL oxidada humana de LDL oxidada en las células, en el que el método incluye la etapa de poner en contacto una célula con una cantidad eficaz de una composición que comprende el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en este documento.

Se contempla que la célula es una célula humana. Se contempla además que la célula está en un sujeto. En un aspecto, se contempla que la célula es una célula endotelial. En otras formas de realización, la célula puede ser uno o más de los macrófagos, monocitos, células dendríticas, células del músculo liso vascular (SMC), condrocitos, y miocitos cardíacos. Se contempla además que el sujeto es humano.

La invención también se refiere a un método de tratar, mejorar, o prevenir un trastorno asociado con LOX-1 en un sujeto, en el que el método incluye la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende el anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de los mismos descritos en el presente documento. En un aspecto, el trastorno asociado con LOX-1 se asocia con claudicación (por ejemplo, la claudicación intermitente, Claudicación Rutherford Clase II/III). En un aspecto, el trastorno asociado con LOX-1 está asociado con angina de pecho (por ejemplo, angina de pecho refractaria). Se contempla que el sujeto es humano.

Cualquiera de los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno anteriores de los mismos pueden ser un anticuerpo monoclonal o fragmentos de unión a antígeno del mismo.

DEFINICIONES

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención.

El término "proteína LOX-1" o "antígeno LOX-1 " o "LOX-1" o "Lox1" se utilizan indistintamente, y se refiere a proteína del Receptor 1 de LDL oxidado similar a lectina en diferentes especies Por ejemplo, LOX-1 humano tiene la secuencia tal como se establece en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1), y se ha descrito en informes y publicaciones anteriores (Nature, Vol. 386, p 73-77, 1997; Genomics, Vol. 54, No 2, p 191-199, 1998;. Biochem. J., Vol. 339, Part 1, P. 177-184, 1999; Numero de Acceso Genbank. NP 002534). Se trata de un receptor no específico clase E, que media la recaptación de oxLDL por las células vasculares y señalización de oxLDL en células vasculares, y, como tal, es un mediador de los efectos tóxicos de oxLDL. LOX-1 se expresa en la superficie de las células endoteliales vasculares y ha sido implicado en la acumulación de monocitos y macrófagos en células endoteliales vasculares.

Además, en el contexto de esta invención, el término "LOX-1" incluye mutantes del receptor de LDL oxidada humana natural, que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la de la estructura primaria nativa (secuencia de aminoácidos) descrita en los informes mencionados anteriormente. Aquí, el término "mutantes del receptor de LDL oxidada humana natural que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos" se refiere a tales proteínas mutantes.

Se ha mostrado que múltiples formas de LDL modificada formada in vitro y/o in vivo se unen a LOX-1. Tal como se usa en el presente documento, el término "LDL modificada" y "LDL oxidada" (y "oxLDL") se usan indistintamente para describir lipoproteínas de baja densidad que se oxidan por células, tales como células endoteliales vasculares, en combinación con diversos factores químicos y físicos (por ejemplo, calor). LDL se oxida, por ejemplo, dentro de la pared vascular en condiciones aterogénicas para formar oxLDL. El término "LDL modificada" puede abarcar los siguientes**:** LDL oxidado, LDL modificada por oxidación con sulfato de cobre, LDL acetilo, LDL clorada (por ejemplo, LDL modificada a través de una reacción de cloración química), LDL modificada con mieloperoxidasa, LDL modificada con hipoclorito, LDL de succinilo, y

LDL modificada con malondialdehído (es decir, LDL modificada a través de la reacción con malondialdehído, que se produce in vivo como consecuencia del estrés oxidativo).

El término "anticuerpo" como se utiliza en la presente se refiere a un anticuerpo entero y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadena simple del mismo. Un anticuerpo entero es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones variables (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs dispuestas desde el extremo amino al extremo 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 unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos huésped o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

El término “porción de unión a antígeno” o “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo como se utiliza en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que retiene la capacidad para unirse específicamente a un antígeno dado (ej., receptor de LDL oxidada humana (LOX-1)). Las funciones de unión a antígenos de un anticuerpo pueden realizarse por fragmentos de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de unión contemplados dentro del término porción de unión al antígeno o fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento $F(ab)_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de bisagra; un fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un solo brazo de un

anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de único dominio (dAb) (Ward, (1989) Nature 341: 544-546), que consta de un dominio VH o un dominio VL; y una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador peptídico artificial que les permite ser hechos como una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird, (1988) Science 242:423-426; y Huston, (1988) Proc Natl Acad . Sci. 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla incluyen una o más porciones de unión a antígeno o fragmentos de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan según la utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

Los fragmentos de unión al antígeno también se pueden incorporar en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y scFv bis-(véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, (2005) Nature Biotechnology 23:19, 1126-1136) . Las porciones de unión al antígeno de los anticuerpos pueden ser injertadas en andamios con base en polipéptidos tales como la fibronectina tipo III (Fn3) (véase la patente de EE.UU. No. 6.703.199, que describe monocuerpos polipeptídicos de fibronectina).

Los fragmentos de unión al antígeno se pueden incorporar en moléculas de cadena única que comprende un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos complementarios de cadena ligera, forman un par de regiones de unión al antígeno (Zapata., (1995) Protein Eng. 8:1057-1062; y Patente de EE.UU. No. 5.641.870).

Como se utiliza en la presente, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigénicos únicos. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del anticuerpo "brazo" interactúa a través de débiles fuerzas no covalentes con el antígeno en numerosos sitios, entre más interacciones, más fuerte es la afinidad. Como se usa en la presente, el término "alta afinidad" de un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo (por ejemplo: un fragmento Fab)

generalmente se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, que tiene una K_D de 10^{-9}M o menos.

El término "aminoácido" se refiere a que ocurre naturalmente y aminoácidos sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican más tarde, por ejemplo, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un ácido amino de origen natural, es decir, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Miméticos de aminoácidos se refieren a los compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero funciona de manera similar que un aminoácido de origen natural.

El término “especificada de unión” como se utiliza en la presente se refiere a la capacidad de un anticuerpo individual que combina sitio para reaccionar con solo un determinante antigénico.

La frase “específicamente (o selectivamente) se une” a un anticuerpo (ej., anticuerpo de unión a LOX-1) se refiere a una reacción de unión que es determinativa de la presencia de un antígeno cognado (ej., un LOX-1 humano o LOX-1 cinomólogo) en una población heteróloga de proteínas y otros biológicos. Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se utilizan indistintamente en la presente con el término “un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno”.

El término "mediado por LOX-1 " se refiere al hecho de que el receptor de LOX-1 media la respuesta celular tras la unión de un ligando de LOX-1, por ejemplo, oxLDL, a LOX-1 en la superficie celular, lo cual disparala célula para aumentar la producción de ciertas moléculas proinflamatorias. El término "gen pro-inflamatoriao" se refiere a un gen que codifica cualquier molécula, tal como, pero no limitado a, una citoquina, una

quimioquina, o una molécula de adhesión celular, que desempeña un papel en un proceso inflamatorio. Los genes "pro-inflamatorios" de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, interleucina-8 (IL-8), molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y la proteína quimiotáctica de monocitos -1 (MCP-1).

Un "trastorno asociado con LOX-1, "condición asociada a LOX-1", "enfermedad o condición asociada con niveles elevados de LOX-1," o términos similares como se usan aquí, se refieren a cualquier número de condiciones o enfermedades en las que los niveles de proteína LOX-1 son aberrantemente altos y/o en los que se busca una reducción de los niveles de proteína LOX-1. Estas condiciones incluyen pero no se limitan a trastornos cardiovasculares, disfunción celular endotelial, trastornos de células endoteliales, aterosclerosis, arteriosclerosis, hipertensión, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, diabetes mellitus, deficiencia de óxido nítrico, infarto de miocardio, estrés oxidativo vascular, isquemia miocárdica, isquemia-reperfusión, sepsis, nefropatía diabética, enfermedad renal, cardiomiopatía, insuficiencia cardiaca, enfermedad arterial periférica, enfermedad cardiaca coronaria, claudicación (por ejemplo, claudicación intermitente, Claudicación Rutherford Clase II / III), enfermedad de la arteria periférica (PAD), angina de pecho (por ejemplo, angina de pecho refractaria), enfermedad arterial coronaria (CAD) (por ejemplo, debido a la aterosclerosis de las arterias que alimentan el corazón), accidente cerebrovascular, y vasodilatación anormal dependiente del endotelio.

"Disfunción de células endoteliales," como se usa aquí, significa la incapacidad de una célula endotelial para mantener su función normal. El endotelio desempeña un papel crítico en la regulación del tono y crecimiento vascular liso , permeabilidad vascular, respuesta inflamatoria, coagulación, y adhesión de plaquetas. Ejemplos no limitantes de la función celular endotelial incluyen mantenimiento del tono vascular equilibrado, inhibición de la trombosis, inhibición de los procesos pro-inflamatorios, mantenimiento de la integridad vascular (por ejemplo, no permeabilidad de la vasculatura), y mantenimiento de un estado anti-proliferativo tanto en el endotelio como en células de músculo liso. Condiciones comunes y factores de riesgo que predisponen a la aterosclerosis, como dislipidemia, hipertensión, diabetes y tabaquismo están todos asociados con la disfunción endotelial, que promueve el desarrollo, progresión y complicaciones de la aterosclerosis. La disfunción endotelial en general ha sido evaluada como la vasodilatación alterada dependiente del endotelio. Esto supone que la

vasodilatación dependiente del endotelio es un marcador sustituto para otras funciones endoteliales importantes. La base para esta suposición es la observación de que el óxido nítrico derivado del endotelio, sintetizado por la NO sintasa endotelial (eNOS) a partir de L-arginina, media la vasodilatación dependiente del endotelio y otras funciones vasculoprotectoras endoteliales. Una creciente base de datos clínicos sugieren que la disfunción endotelial (vasodilatación alterada dependiente del endotelio) está estrechamente asociada con eventos adversos cardiovasculares mayores, incluyendo isquemia miocárdica e infarto, lsíndromes coronarios agudos, claudicación e isquemia crítica de las extremidades, ataques isquémicos transitorios y accidentes cerebrovasculares.

La acumulación de datos experimentales también sugiere que la disponibilidad de óxido nítrico derivada de wNOS endotelial y endocadial no sólo puede conducir a la la disfunción y remodelación ventricular izquierda anormal contribuyendo al desarrollo y progresión de la insuficiencia cardíaca.

Un "trastorno de células endoteliales," tal como se usa en el presente documento, es cualquier trastorno que se caracteriza por disfunción de células endoteliales. Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos que se caracterizan por la disfunción de las células endoteliales incluyen trastornos angiogénicos tales como cánceres que requieren neovascularización para apoyar el crecimiento tumoral, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunes, malformaciones vasculares, síndrome de DiGeorge, HHT, hemangioma cavernoso, arteriopatía de trasplante, estenosis de acceso vascular asociado con hemodiálisis, vasculitis, vasculitidis, trastornos inflamatorios vasculares, aterosclerosis, obesidad, psoriasis, verrugas, dermatitis alérgica, cicatrices queloides, granulomas piógenos, enfermedad ampollosa, sarcoma de Kaposi, síndrome vítreo hiperplásico persistente, retinopatía del prematuro, neovascularización coroidea, degeneración macular, retinopatía diabética, neovascularización ocular, hipertensión pulmonar primaria, asma, pólipos nasales, enfermedad intestinal inflamatoria y periodontal, ascitis, adhesiones peritoneales, anticoncepción, endometriosis, sangrado uterino, quistes ováricos, hiperestimulación ovárica, artritis, artritis reumatoide, reumatismo articular crónico, sinovitis, osteoartritis, osteomielitis, formación de osteofitos, sepsis y fuga vascular. La disfunción de células endoteliales se puede determinar usando ensayos conocidos en la técnica, incluyendo la detección de la

expresión aumentada de moléculas de adhesión endoteliales o disminución de la expresión o la actividad biológica de la sintasa de óxido nítrico (eNOS).

"Claudicación", como se usa aquí, incluye claudicación severa y otros términos similares, y describe un impedimento de movilidad y alta necesidad médica no cubierta. La claudicación es una condición caracterizada por una menor isquemia de las extremidades, causando fatiga muscular, dolor por el esfuerzo se alivia con el reposo, movilidad limitada y reducida calidad de vida, y es causada por la aterosclerosis y vasodilatación anormal (por ejemplo, alterada) dependiente del endotelio. Su prevalencia en los EE.UU. es de 8-12 millones de pacientes. Entre pacientes con claudicación intermitente, el 7% se someterá a una cirugía de derivación de extremidades inferiores, 4% requerirá amputaciones mayores, y el 16% desarrollará empeoramiento de claudicación. Los eventos cardiovasculares, como el infarto de miocardio y accidente cerebrovascular, se producen en el 20% de los enfermos de claudicación grave de más de 5 años. El tratamiento actual es quirúrgico y el tratamiento a través de medios menos invasivos, como la administración de los anticuerpos anti-LOX-1 de la invención, representaría un enorme avance terapéutico.

"La angina refractaria," como se usa aquí, es una condición caracterizada por dolor en el pecho debido a la isquemia del músculo cardíaco, por lo general debido a la obstrucción o espasmo de las arterias coronarias (por ejemplo, de la enfermedad de las arterias coronarias), con síntomas debilitantes, actividad física muy limitada y la mala calidad de vida. Los 1-1.8 millones de pacientes que sufren de angina de pecho refractaria en EE.UU. experimentan aumento de la mortalidad cardiovascular, a razón de 10% por año; al menos 100.000 nuevos casos de angina refractaria surgen por año.

El término "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable) está unido a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y / o especies o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc; o (b) la región variable, o una parte de la misma, se ve alterada, sustituida o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada. Por ejemplo, un anticuerpo de ratón puede ser modificado mediante la sustitución de su región

constante por la región constante de una inmunoglobulina humana. Debido a la sustitución con una región constante humana, el anticuerpo quimérico puede conservar su especificidad en el reconocimiento del antígeno, mientras tiene antigenicidad reducida en humanos en comparación con el anticuerpo de ratón original.

El término "variante modificada de manera conservativa" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como a secuencias de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, las variantes modificadas conservadoramente se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas de ácido, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde se especifica una alanina mediante un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es comúnmente el único codón para metionina, y TGG, que es comunmente el único codón para triptófano) puede ser modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Para las secuencias de polipéptidos, "variantes modificadas de manera conservativa" incluyen sustituciones individuales, deleciones o adiciones a una secuencia de polipéptidos lo cual da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas conservativamente son adicionales a y no excluyen las variantes polimórficas, homólogos interespecies, y alelos de la invención. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M),

Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T), y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)). En algunas realizaciones, el término "modificaciones de secuencia conservativas" se utiliza para referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan significativamente o alteran las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos.

El término “epítopo” significa un determinante proteico capaz de unión específica a un anticuerpo. Los epítopos consisten generalmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y pueden tener característas estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros y no a los últimos se pierde en presencia de solventes desnaturalizantes.

El término "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente, incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones variables como CDR se derivan a partir de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva a partir de tales secuencias humanas, ej., secuencias de línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica a sitio in vitro o por mutación somática in vivo).

El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una sola especificidad de unión que tienen regiones variables en las que tanto las regiones variables como las regiones CDR se derivan de secuencias humanas. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada .

Un anticuerpo “humanizado” es un anticuerpo que retiene la reactividad de un anticuerpo no humano mientras es menos inmunogénico en humanos. Esto puede

lograrse por ejemplo, al retener las regiones CDR no humanas y reemplazar las restantes partes del anticuerpo por sus contrapartes humanas (es decir, la región constante así como las porciones variables de la región variable). Vease, por ejemplo Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65-92, 1988; Verhoeyen *et al.*, Science, 239:1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991; and Padlan, Molec. Immun., 31:169-217, 1994. Otros ejemplos de tecnología de ingeniería humana incluyen, pero no se limitan a Xoma technology divulgada en US 5,766,886.

Los términos "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, identidad de 60%, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad sobre una región especificada, o, cuando no se especifica, sobre toda la secuencia), cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, existe identidad en una región que tiene al menos aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferiblemente en una región que tiene de 100 a 500 o 1000 nucleótidos o más (o 20, 50, 200 o más aminoácidos ácidos) de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en una computadora, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Los parámetros predeterminados del programa se puede utilizar, o parámetros alternativos pueden ser designados. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces las identidades de secuencia por ciento para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se utiliza en la presente, incluye la referencia a un segmento de uno cualquiera del número de posiciones contiguas

seleccionadas del grupo que consta de 20 a 600, por lo general 50 a 200 aproximadamente, más habitualmente 100 a 150 aproximadamente en el cual una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias están alineadas óptimamente. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482 c, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU. 85:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Brent ., (2003) Current Protocols in Molécular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou ed., 2003)).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul, (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; y Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990, respectivamente. El software para realizar el análisis BLAST está públicamente disponible a través del Centro Nacional de Información de Biotecnología. Este algoritmo implica primero la identificación de pares de secuencias de alta puntuación (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que bien sea corresponden o satisfacen algunos puntajes T umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T conocido como el umbral de puntuación de palabra adyacente (Altschul, Supra). Estas coincidencias de palabra adyacente inicial actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largos que los contienen. Los hits de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como la puntuación de alineamiento acumulativa pueda ser aumentada. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre> 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, una matriz de puntuación se utiliza para calcular la puntuación

acumulativa. La extensión de los hits de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X de su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa ; o el final de cada secuencia es alcanzado. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:5873-5787, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0.2, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.01, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 0.001.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci. 4:11-17 (1988)) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2,0), utilizando una tabla de residuo de peso PAM120, una penalización de longitud de brecha de 12 y una penalización por brecha de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol, Biol. 48:444-453 (1970)) que ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando ya sea una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Aparte de porcentaje de identidad de secuencia se indicó anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico tiene inmunológicamente reactividad cruzada con los anticuerpos dirigidos contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Así, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Sin embargo, otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que los mismos cebadores pueden usarse para amplificar la secuencia.

El término "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a LOX-1 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a a antígenos distintos de LOX-1). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a LOX-1 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

El término “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpos (*ej.*, IgM, IgE, IgG tal como IgG1 o IgG4) que es proporcionado por los genes de región constante de cadena pesada. Isotipo también incluye versiones modificadas de una de estas clases, donde las modificaciones se han realizado para alterar la función Fc, por ejemplo, para aumentar o reducir las funciones efectoras o unión a los receptores Fc.

El término "K_{assoc}" o "K_a", como se utiliza en la presente, se refiere a la tasa de asociación de una determinada interacción anticuerpo-antígeno, mientras que el término "k_{dis}" o "K_d", como se utiliza en la presente, se refiere a la tasa de disociación de una determinada interacción anticuerpo-antígeno. El término "K_D", como se utiliza en la presente, se refiere a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la proporción de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Valores K_D de los anticuerpos se pueden determinar usando métodos bien establecidos en la técnica. Métodos para determinar K_D de un anticuerpo incluyen medir la resonancia de plasmón

superficial utilizando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®, o medir la afinidad en solución por evaluación de solución en equilibrio (SET).

Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” como se utilizan en la presente se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad de unión y afinidad para un epítopo particular.

El término "ácido nucleico" se usa en la presente de manera intercambiable con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces de esqueleto modificado, que son sintéticos, de origen natural, y que se producen de forma no natural, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de una manera similar a la nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos 2-O-metilo, ácidos péptido-nucleicos (PNA).

A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácidos nucleicos particular abarca también implícitamente variantes modificadas conservativamente de los mismos (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, como se detalla a continuación, sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir por generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer, (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985; y Rossolini, Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994).

El término "operativamente unido" se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos polinucleótidos (por ejemplo, ADN). Típicamente, el término se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora transcripcional a una secuencia transcrita. Por ejemplo, una secuencia promotora o potenciadora está unida operativamente a una secuencia codificadora si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificadora en una célula hospedera apropiada u otro sistema de expresión.

Generalmente, secuencias reguladoras transcripcionales promotoras que están unidas operativamente a una secuencia transcrita están físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es decir, son de actuación cis. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras transcripcionales, tales como potenciadoras, no necesitan estar físicamente contiguas o situadas en las proximidades de las secuencias codificadoras cuya transcripción mejoran.

El término "optimizado" como se utiliza en la presente se refiere a una secuencia de nucleótidos que ha sido alterada para codificar una secuencia de aminoácidos utilizando codones que son preferidos en la producción de células o un organismo, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de Pichia, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada es diseñada para retener completamente o tanto como sea posible la secuencia de aminoácidos originalmente codificada por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como la secuencia "precursora". Las secuencias optimizadas en este documento han sido modificadas para tener codones que son preferidos en las células de mamíferos. Sin embargo, la expresión optimizada de estas secuencias en otras células eucariotas o células procariotas, también se prevé en el presente documento. Las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias nucleotídicas optimizadas también se conocen como optimizadas.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. A menos que se indique otra cosa, una secuencia polipeptídica particular abarca también implícitamente variantes modificadas de manera conservativa de la misma.

El término "anticuerpo humano recombinante ", como se utiliza en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosomal para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos, anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante, combinatoria de anticuerpos

humanos, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica corte y empalme de la totalidad o una porción de un gen de inmunoglobulina humana, secuencias a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones variables y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a mutagénesis in vitro (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática in vivo) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con secuencias VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de anticuerpos de línea germinal humana in vivo.

El término “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”) se refiere a una célula en la cual un vector de expresión recombinante se ha introducido. Se debe entender que tales términos tienen el propósito de referirse no solo a la célula objetivo particular sino a la progenie de tal célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones posteriores debido a bien sea la mutación o influencias ambientales, tal progenie no puede, en realidad, ser idéntica a la célula precursora, pero están aún incluidas dentro del alcance del término “célula huésped” como se utiliza en la presente.

El término "sujeto" incluye animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados (ej.: Mamíferos y no mamíferos) tales como, primates no humanos (ej.: monos cinomolgus, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, y réptiles. Excepto cuando se indica, los términos "paciente" o "sujeto" se usan en la presente de forma intercambiable. Como se usa en el presente documento, los términos "cyno" o "cynomolgus" se refieren al mono cynomolgus (Macaca fascicularis).

Como se utiliza en la presente, el término “tratar”, o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno (ej., trastorno asociado con LOX-1) se refiere en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, retardar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización “tratar” o “tratamiento” se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico incluyendo aquellos los cuales pueden ser no discernibles por el paciente. En aún otra

realización, “tratar” o “tratamiento” se refiere a modular la enfermedad o trastorno, bien sea físicamente, (*ej.*, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (*ej.*, estabilización de un parámetro físico), o ambos. En aún otra realización, “tratar” o “tratamiento” se refiere a prevenir o retardar el comienzo o desarrollo o progresión de la enfermedad o trastorno.

"Prevención" se refiere a las indicaciones descritas en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, trastorno asociado a LOX-1 , significa cualquier acción que previene o retarda un empeoramiento en, por ejemplo, parámetros de enfermedad asociados con LOX-1, como se describe a continuación, en un paciente en riesgo de dicho empeoramiento.

El término "vector" pretende referirse a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido al que se ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar. Otro tipo de vector es un vector viral, tal como un vector viral adeno-asociado (AAV, o AAV2), en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores mamíferos no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula hospedera, y de ese modo se replican junto con el genoma hospedero. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en la presente "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que sirven para funciones equivalentes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1A-1C representan la inhibición de la unión de OxLDL a la proteína LOX-1 por los anticuerpos LOX-1 de la invención. La figura 1A muestra OxLDL de alta unión, la Figura 1B muestra malondialdehído-LDL, y la Figura 1C muestra LDL modificada por hipoclorito, todo como se describe en el presente documento.

La Figura 2 representa anticuerpos LOX-1 que inhiben la unión de OxLDL Dil-rotulada a células HEK293 transfectadas de LOX-1 humano.

La Figura 3 representa una curva de respuesta a la dosis de inhibición de anticuerpos LOX-1 de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por oxLDL en células de HEK293 transfectadas de LOX-1 humano.

Las Figuras 4A-4F muestran anticuerpos LOX-1 (anticuerpos solos o en presencia de un Fab2 entrecruzante) que inhiben la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por oxLDL en células HEK293 transfectadas por LOX-1 humano. La figura 4A muestra el anticuerpo FF1, la figura 4B muestra el anticuerpo FF3, la Figura 4C muestra el anticuerpo FF4, la Figura 4D muestra el anticuerpo FF5, la Figura 4E muestra el anticuerpo FF6, y la figura 4F muestra hIgG1-LALA de control.

La Figura 5 representa anticuerpos LOX-1 que se unen a LOX-1 en la superficie de neutrófilos humanos.

Las figuras 6A-6B representan la determinación de la constante de disociación de anticuerpos (KD) mediante ensayos de valoración de equilibrio con solución (SET) con proteínas APP-Avi-LOX-1 humanas o de mono cynomolgus. La Figura 6A representa los datos para LOX-1 humana, y la Figura 6B representa los datos para LOX-1 de mono cynomolgus.

DESCRIPCION DETALLADA

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de moléculas de anticuerpos que se unen específicamente a LOX-1 e inhiben sus actividades biológicas. La invención se refiere tanto a los anticuerpos de de formato IgG completo, así como a fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tales como fragmentos Fab (por ejemplo, anticuerpos E2E10, FF1, FF3, FF4, FF5, FF6).

Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a LOX-1 (por ejemplo, LOX-1 humana, LOX-1 de cynomolgus), composiciones farmacéuticas, métodos de producción, y métodos de uso de tales anticuerpos y composiciones.

Proteínas LOX-1

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a LOX-1 e inhiben sus actividades biológicas, incluyendo sus actividades pro-oxidantes y pro-inflamatorias. LOX-1, un receptor para las LDL modificadas por oxidación (oxLDLs), se expresa en la superficie de las células vasculares (células endoteliales y células de músculo liso), neutrófilos, monocitos y macrófagos, y plaquetas. Además, LOX-1 está regulada positivamente en enfermedades vasculares, incluyendo en lesiones ateroscleróticas humanas y animales (Kataoka H, et al, Circulation 99;3110-3117). LOX-1 también está regulada positivamente en las enfermedades sistémicas autoinmunes / inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide, uveítis, degeneración macular relacionada con la edad, y pre-eclampsia). OxLDLs están implicados en la patogénesis de la enfermedad vascular. Además de oxLDLs, LOX-1 se une otros ligandos, incluyendo LDL acetilado, productos finales de glicación avanzada (AGE), proteína de choque térmico 70, (HSP70), células apoptóticas, eritrocitos madurados, plaquetas activadas, bacterias, fosfatidilserina, y proteína C reactiva (CRP).

LOX-1 es una proteína de membrana tipo II, que pertenece a la familia de lectina tipo C. LOX-1 también se clasifica como un receptor no definido clase E. LOX-1 consta de 4 dominios: un dominio citoplasmático N-terminal corto, una región transmembrana, un cuello de conexión, y un dominio similar a la lectina en el extremo C-terminal. El dominio tipo lectina C-terminal (CTLD; también se conoce como el dominio de unión a LDL-ox) es el dominio de unión a ligando (Sawamura T, y otros, Nature 386;. 73-77;. Shi

X, et al, J Cell Sci. . 114; 1273-1282). LOX-1 humano tiene la secuencia tal como se establece en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1), y se ha descrito en informes y publicaciones anteriores (Nature, Vol. 386, p 73-77, 1997; Genomics, Vol. 54, No 2, p 191-199, 1998;. Biochem. J., Vol. 339, Part 1, P. 177-184, 1999; Numero de Acceso Genbank. NP 002534).

La vía LDLox / LOX-1 contribuye al estrés oxidativo, inflamación vascular, aterosclerosis, y flujo sanguíneo tisular deteriorado y liberación de oxígeno. La activación de LOX-1 mediante la unión de ligandos de LOX-1 (por ejemplo, oxLDLs) resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno debido a la activación de la NADPH oxidasa, y la posterior activación de NFkB y las vías de la MAP quinasa resultando en inflamación. La vía de señalización oxLDL/LOX-1 actúa como un bucle de retroalimentación positiva, ya que la especie reactiva de oxigeno resulta en la formación de LDL-ox adicional y regula positivamente la expresión de LOX-1. La unión de oxLDLs a LOX-1 expresada en la superficie de los macrófagos también se traduce en la recaptación de oxLDL que contribuye a la formación de células espumosas y aterosclerosis. De manera importante, se piensa que la inflamación vascular es crítica para la patobiología de complicaciones trombóticas agudas de aterosclerosis, incluyendo infarto de miocardio y accidente cerebrovascular isquémico. Se ha mostrado que la activación de LOX-1 altera la función vasomotora al alterar la vasodilatación por un mecanismo que implica la NADPH oxidasa. Se ha mostrado que el deterioro de la vasodilatación se produce en pacientes con enfermedad arterial coronaria crónica y angina de pecho, y en pacientes con enfermedad arterial periférica y claudicación. Los estudios con ratones knockout LOX-1 y anticuerpos antagonistas LOX-1 han demostrado que la inhibición de LOX-1 puede tener efectos cardiovasculares beneficiosos. Por ejemplo, la anulación de LOX-1 previene el deterioro mediado -LDLox de vasodilatación y reduce la aterosclerosis (Mehta et al, Circulation Research 2007, 100: 1634). Además, se ha mostrado que los anticuerpos anti-LOX-1 (i) bloquean el estrés oxidativo inducido LDLox en las células endoteliales humanas (Ou, J Appl Phys. 2010, 108:1745.); y (ii) inhiben la producción de superóxido y restauran la expresión de eNOS, lo que mejora la biodisponibilidad de NO y la vasodilatación (Xu, Arteriosclerosis, Trombosis y Biología Vascular 2007, 27:871-877).

Se propone que la inhibición de LOX-1, por ejemplo a través de la administración de los anticuerpos anti-LOX-1 de la invención, mejorará el flujo sanguíneo y el

suministro de oxígeno al tejido isquémico, lo que resulta en un beneficio terapéutico a los pacientes con enfermedad vascular crónica, incluyendo angina de pecho, claudicación e isquemia crítica de las extremidades. La inhibición de LOX-1, por ejemplo a través de la administración de anticuerpos anti-LOX-1 de la invención, puede también retrasar o revertir la progresión de la aterosclerosis y reducir la incidencia de sus complicaciones trombóticas agudas (por ejemplo, síndrome coronario agudo, angina inestable, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular isquémico).

Anticuerpos LOX-1 & Fragmentos de Unión al Antígeno

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a LOX-1. En algunas formas de realización, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a LOX-1 humano y de mono cynomolgus. Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos humanos monoclonales y los Fab, aislados como se describe en los Ejemplos.

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LOX-1 (por ejemplo, LOX-1 humano y de cynomolgus), en donde los anticuerpos comprenden un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, o 94. La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LOX-1, en donde los anticuerpos comprenden una CDR VH que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR VH listadas en la Tabla 1, más adelante. En particular, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LOX-1 (ej., LOX-1 humano o cinomólogo), en donde los anticuerpos comprenden (o alternativamente, constan de) uno, dos, tres o más CDRs VH que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDRs VH listadas en la Tabla 1 más adelante.

La presente invención proporciona anticuerpos que especificamente se fijan a una proteína LOX-1, dichos anticuerpos que comprenden un dominio VL que tiene una secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 24, 44, 64, 84, o 104. La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LOX-1 (LOX-1 humano y de cynmolgus) dichos anticuerpos que comprenden una CDR VL que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDRs VL listadas en la Tabla 2,

más adelante. En particular, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LOX-1 (ej., LOX-1 humano o cinomólogo), en donde los anticuerpos comprenden (o alternativamente, constan de) uno, dos, tres o más CDRs VL que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDRs VL listadas en la Tabla 1 más adelante.

Otros anticuerpos de la invención incluyen aminoácidos que han sido mutados, pero tienen al menos 60%, 70%, 80%, 90%, o 95% de identidad en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en las secuencias descritas en la Tabla 2. En algunas realizaciones, ésta incluye secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han mutado en las regiones CDR, en comparación con las regiones CDR representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1.

La presente invención también proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican VH, VL, la cadena pesada de longitud completa, y la cadena ligera de longitud completa de los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LOX-1 (por ejemplo, LOX-1 humano y cinomólogo). Tales secuencias de ácido nucleico pueden optimizarse para expresión en células mamíferas (por ejemplo, la Tabla 1 muestra las secuencias optimizadas de ácidos nucleicos para la cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos de la invención).

Tabla 1. Ejemplos de Anticuerpos LOX-1, Fabs y Proteínas LOX-1

Descripción de Secuencia	Identificador de Secuencia (SEQ ID NO:)	Secuencia de aminoácidos o polinucleotidos
Secuencia de proteínas de longitud completa de LOX-1 humano(Secuencia de Referencia NCBI: NM_002543.3)	1	MTFDDLKIQTVKDQPDEKSNGKKAKGLQFLYSPWWCLAA ATLGVLCLGLVVTIMVLGMQLSQVSDLLTQEQANLTHQKK KLEGQISARQQAEEASQESENELKEMIETLARKLNEKSKEQ MELHHQNLNLQETLKRVANCSAPCPQDWIWHGENCYLFSS GSFNWEKSQEKCLSLDAKLLKINSTADLDFIQQAISYSSFPF WMGLSRRNPSYPWLWEDGSPLMPHLFRVRGAVSQTYPSGT CAYIQRGAVYAENCILAAFSICQKKANLRAQ
Secuencia de Nucleotidos de Longitud Completa de LOX-1 humano(Secuencia de Referencia	2	ATGACTTTTGATGACCTAAAGATCCAGACTGTGAAGGAC CAGCCTGATGAGAAGTCAAATGGAAAAAAAGCTAAAGG TCTTCAGTTTCTTTACTCTCCATGGTGGTGCCTGGCTGCTG CGACTCTAGGGGTCCTTTGCCTGGGATTAGTAGTGACCAT TATGGTGCTGGGCATGCAATTATCCCAGGTGTCTGACCTC CTAACACAAGAGCAAGCAAACCTAACTCACCAGAAAAA

NCBI: NM_002543.3)		GAAACTGGAGGGACAGATCTCAGCCCGGCAACAAGCAG AAGAAGCTTCACAGGAGTCAGAAAACGAACTCAAGGAA ATGATAGAAACCCTTGCTCGGAAGCTGAATGAGAAATCC AAAGAGCAAATGGAACTTCACCACCAGAATCTGAATCTC CAAGAAACACTGAAGAGAGTAGCAAATTGTTCAGCTCCT TGTCCGCAAGACTGGATCTGGCATGGAGAAAACTGTTAC CTATTTTCCTCGGGCTCATTTAACTGGGAAAAGAGCCAA GAGAAGTGCTTGTCTTTGGATGCCAAGTTGCTGAAAATT AATAGCACAGCTGATCTGGACTTCATCCAGCAAGCAATT TCCTATTCCAGTTTTCCATTCTGGATGGGGCTGTCTCGGA GGAACCCCAGCTACCCATGGCTCTGGGAGGACGGTTCTC CTTTGATGCCCCACTTATTTAGAGTCCGAGGCGCTGTCTC CCAGACATACCCTTCAGGTACCTGTGCATATATACAACG AGGAGCTGTTTATGCGGAAAACTGCATTTTAGCTGCCTTC AGTATATGTCAGAAGAAGGCAAACCTAAGAGCACAG
Secuencia de aminoácidos de APP-Avi maduro - LOX-1 soluble humano (61-273) (etiquetas APP y Avi subrayadas)	6	EFRHGLNDIFEAQKIEWHESQVSDLLTQEQANLTHQKKKLE GQISARQQAEEASQESENELKEMIETLARKLNEKSKEQMEL HHQNLNLQETLKRVANCSAPCPQDWIWHGENCYLFSSGSF NWEKSQEKCLSLDAKLLKINSTADLDFIQQAISYSSFPFWM GLSRRNPSYPWLWEDGSPLMPHLFRVRGAVSQTYPSGTCA YIQRGAVYAENCILAAFSICQKKANLRAQ
Secuencia de nucleotidos de APP-Avi-LOX-1 soluble humano LOX-1(61-273) (Plasnova# NPL014428)	7	ATGCCCCTGCTGCTGCTCCTCCCCCTGCTGTGGGCTGGCG CCCTGGCCGAGTTCCGGCACGGCCTGAACGACATCTTCG AGGCCCAGAAAATCGAGTGGCACGAGAGCCAGGTGTCC GATCTGCTGACCCAGGAACAGGCCAACCTGACCCACCAG AAGAAGAAGCTGGAAGGCCAGATCAGCGCCAGACAGCA GGCCGAGGAAGCCAGCCAGGAAAGCGAGAACGAGCTGA AAGAGATGATCGAGACACTGGCCCGGAAGCTGAACGAG AAGTCCAAAGAACAGATGGAACTGCACCACCAGAACCTG AATCTGCAGGAAACCCTGAAGCGGGTCGCCAACTGCAGC GCCCCCTGCCCCCAGGACTGGATCTGGCACGGCGAGAAC TGCTACCTGTTCAGCAGCGGCAGCTTCAACTGGGAGAAG TCCCAGGAAAAGTGCCTGAGCCTGGACGCCAAGCTGCTG AAGATCAACAGCACCGCCGACCTGGACTTCATCCAGCAG GCCATCAGCTACAGCAGCTTCCCTTTCTGGATGGGCCTGA GCCGGCGGAACCCCAGCTACCCTTGGCTCTGGGAGGACG GCAGCCCCCTGATGCCCCACCTGTTCAGAGTGCGGGGAG CTGTGAGCCAGACCTACCCCAGCGGCACCTGTGCCTACA TCCAGCGCGGAGCCGTGTACGCCGAGAACTGCATCCTGG CCGCCTTCAGCATCTGCCAGAAGAAGGCCAATCTGCGGG CCCAGTAATAA
FF1		
HCDR1 (Kabat)	8	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	9	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	10	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	11	GYTFTDY

HCDR2 (Chothia)	12	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	13	WLPMDY
VH	14	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSTSTA YMELSSLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSS
VH que codifica ADN	15	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctctacctccaccgcctacatggaactgtc ctccctgcggagcgacgacaccgccgtgtactactgtgcccggtggctgcccatggactattg ggccagggcaccctcgtgaccgtgtcctct
Cadena Pesada	16	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSTSTA YMELSSLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ADN que codifica Cadena Pesada	17	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctctacctccaccgcctacatggaactgtc ctccctgcggagcgacgacaccgccgtgtactactgtgcccggtggctgcccatggactattg ggccagggcaccctcgtgaccgtgtcctctgcttctaccaagggcccttccgtgttccctctgg ccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtgaaggactactt ccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgaccagcggagtgcacaccttccct gccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtggtgacagtgccttcctccagcct gggcacacagacctacatctgcaacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaagc gggtggagcctaagtcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagccg

		ctggcggcccttctgtgtttctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggacc cctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaagtgaagttcaattggt acgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgggaggaacagtacaactc cacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagaat acaagtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaaggcca agggccagcctagggaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgaccaa gaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccttccgatatcgccgtggagtgg gagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctggactccgacgg ctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttct cctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgtctcc cggcaag
LCDR1 (Kabat)	18	RASQGINNWLV
LCDR2 (Kabat)	19	AASSLQS
LCDR3 (Kabat)	20	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	21	SQGINNW
LCDR2 (Chothia)	22	AAS
LCDR3 (Chothia)	23	YLITPY
VL	24	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
ADN que codifica VL	25	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaagctgctgatctacgctgcctccagtctgcagtccggcgtgccctctagattctccg gctctggctctggcgccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcgcca cctactactgccagcagtacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaa tcaag
Cadena Ligera	26	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
Cadena Ligera de	27	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca

ADN		cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaagctgctgatctacgctgcctccagtctgcagtccggcgtgccctctagattctccg gctctggctctggcgccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcgcca cctactactgccagcagtacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaa tcaagcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcagctgaaga gcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggccaaggtgcag tggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggac agcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgaga agcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagag cttcaacaggggcgagtgc
FF3		
HCDR1 (Kabat)	28	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	29	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	30	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	31	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	32	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	33	WLPMDY
VH	34	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSS
VH de ADN	35	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactg gggccagggcacactcgtgaccgtgtcctct
Cadena Pesada	36	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH

		NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Cadena Pesada de ADN	37	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactg gggccagggcacactcgtgaccgtgtcctctgcttccaccaagggcccttccgtgttccctctg gcccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtgaaggactac ttccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgaccagcggagtgcacaccttcc ctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtggtgacagtgccttcctccagc ctgggcacacagacctacatctgcaacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaa gcgggtggagcctaagtcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagc cgctggcggcccttctgtgtttctgttcccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga cccctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaagtgaagttcaattg gtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgggaggaacagtacaa ctccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaag aatacaagtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaagg ccaagggccagcctagggaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgac caagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccttccgatatcgccgtggagt gggagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctggactccgac ggctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgt tctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgtct cccggcaag
LCDR1 (Kabat)	38	RASQGINNWLV
LCDR2 (Kabat)	39	AASSLQS
LCDR3 (Kabat)	40	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	41	SQGINNW
LCDR2 (Chothia)	42	AAS
LCDR3 (Chothia)	43	YLITPY
VL	44	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG

		KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
VL de ADN	45	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaagctgctgatctacgctgcctccagtctgcagtccggcgtgccctctagattctccg gctctggctctggcgccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcgcca cctactactgccagcagtacctgatcacccccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaa tcaag
Cadena Ligera	46	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
Cadena Ligera de ADN	47	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaagctgctgatctacgctgcctccagtctgcagtccggcgtgccctctagattctccg gctctggctctggcgccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcgcca cctactactgccagcagtacctgatcacccccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaa tcaagcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcagctgaaga gcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggccaaggtgcag tggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggac agcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgaga agcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagag cttcaacaggggcgagtgc
FF4		
HCDR1 (Kabat)	48	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	49	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	50	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	51	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	52	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	53	WLPMDY
VH	54	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ

		APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSS
VH de ADN	55	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactg gggccagggcacactcgtgaccgtgtcctct
Cadena Pesada	56	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Cadena Pesada de ADN	57	Caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactg gggccagggcacactcgtgaccgtgtcctctgcttccaccaagggcccttccgtgttccctctg gcccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtgaaggactac ttccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgaccagcggagtgcacaccttcc ctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtggtgacagtgccttcctccagc ctgggcacacagacctacatctgcaacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaa gcgggtggagcctaagtcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagc cgctggcggcccttctgtgtttctgttcccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga cccctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaagtgaagttcaattg gtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgggaggaacagtacaa

		ctccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaag aatacaagtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaagg ccaagggccagcctagggaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgac caagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccttccgatatcgccgtggagt gggagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctggactccgac ggctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgt tctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgtct cccggcaag
LCDR1 (Kabat)	58	RASQGITNWLA
LCDR2 (Kabat)	59	AASILES
LCDR3 (Kabat)	60	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	61	SQGITNW
LCDR2 (Chothia)	62	AAS
LCDR3 (Chothia)	63	YLITPY
VL	64	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGITNWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASILESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIAT YYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
VL de ADN	65	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaccaactggctggcctggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaagctgctgatctacgccgcctccatcctggaatccggcgtgccctctagattctccg gctctggctctggcaccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccac ctactactgccagcagtacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaat caag
Cadena Ligera	66	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGITNWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASILESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIAT YYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
Cadena Ligera de ADN	67	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaccaactggctggcctggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaagctgctgatctacgccgcctccatcctggaatccggcgtgccctctagattctccg gctctggctctggcaccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccac

		ctactactgccagcagtacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaat caagcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatcttccccccaagcgacgagcagctgaaga gcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggccaaggtgcag tggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggac agcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgaga agcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagag cttcaacaggggcgagtgc
FF5		
HCDR1 (Kabat)	68	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	69	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	70	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	71	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	72	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	73	WLPMDY
VH	74	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSS
VH de ADN	75	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactg gggccagggcacactcgtgaccgtgtcctct
Cadena Pesada	76	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

		SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Cadena Pesada de ADN	77	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactg gggccagggcacactcgtgaccgtgtcctctgcttccaccaagggcccttccgtgttccctctg gcccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtgaaggactac ttccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgaccagcggagtgcacaccttcc ctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtggtgacagtgccttcctccagc ctgggcacacagacctacatctgcaacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaa gcgggtggagcctaagtcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagc cgctggcggcccttctgtgtttctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga cccctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaagtgaagttcaattg gtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgggaggaacagtacaa ctccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaag aatacaagtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaagg ccaagggccagcctagggaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgac caagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccttccgatatcgccgtggagt gggagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctggactccgac ggctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgt tctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgtct cccggcaag
LCDR1 (Kabat)	78	RASQGINNWLV
LCDR2 (Kabat)	79	AASRLES
LCDR3 (Kabat)	80	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	81	SQGINNW
LCDR2 (Chothia)	82	AAS
LCDR3 (Chothia)	83	YLITPY
VL	84	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG KAPKLLLYAASRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
VL de ADN	85	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca

		cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaaactgctgctgtacgccgcctccagactggaatctggcgtgccctccagattctccg gctctggctctggcaccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccac ctactactgccagcagtacctgatcacccccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaat caag
Cadena Ligera	86	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG KAPKLLLYAASRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
Cadena Ligera de ADN	87	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaaactgctgctgtacgccgcctccagactggaatctggcgtgccctccagattctccg gctctggctctggcaccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccac ctactactgccagcagtacctgatcacccccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaat caagcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcagctgaaga gcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggccaaggtgcag tggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggac agcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgaga agcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagag cttcaacaggggcgagtgc
FF6		
HCDR1 (Kabat)	88	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	89	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	90	WLPIDY
HCDR1 (Chothia)	91	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	92	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	93	WLPIDY
VH	94	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPIDYWGQGTLVTVSS
VH de ADN	95	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc

		ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatcgactactg ggccagggcacactcgtgaccgtgtcctct
Cadena Pesada	96	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPIDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Cadena Pesada de ADN	97	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatcgactactg gggccagggcacactcgtgaccgtgtcctctgcttccaccaagggcccttccgtgttccctctg gccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtgaaggactac ttccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgaccagcggagtgcacaccttcc ctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtggtgacagtgccttcctccagc ctgggcacacagacctacatctgcaacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaa gcgggtggagcctaagtcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagc cgctggcggcccttctgtgtttctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga cccctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaagtgaagttcaattg gtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgggaggaacagtacaa ctccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaag aatacaagtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaagg ccaagggccagcctagggaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgac

		caagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccttccgatatcgccgtggagt gggagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctggactccgac ggctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgt tctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgtct cccggcaag
LCDR1 (Kabat)	98	RASQGINNWLV
LCDR2 (Kabat)	99	AASRLES
LCDR3 (Kabat)	100	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	101	SQGINNW
LCDR2 (Chothia)	102	AAS
LCDR3 (Chothia)	103	YLITPY
VL	104	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG KAPKLLLYAASRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
VL de AND	105	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaaactgctgctgtacgccgcctccagactggaatctggcgtgccctccagattctccg gctctggctctggcaccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccac ctactactgccagcagtacctgatcacccccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaat caag
Cadena Ligera	106	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG KAPKLLLYAASRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
Cadena Ligera de ADN	107	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaaactgctgctgtacgccgcctccagactggaatctggcgtgccctccagattctccg gctctggctctggcaccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccac ctactactgccagcagtacctgatcacccccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaat caagcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcagctgaaga gcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggccaaggtgcag

		tggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggac agcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgaga agcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagag cttcaacaggggcgagtgc
E2E10 (murino precursor)		
HCDR1 (Kabat)	108	DYEMH
HCDR2 (Kabat)	109	AIHPGSGGAAYIQKFKG
HCDR3 (Kabat)	110	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	111	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	112	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	113	WLPMDY
VH	114	QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFTDYEMHWVKQ TPVHGLEWIGAIHPGSGGAAYIQKFKGKATLTADKSSSTAH MELSSLTSEDSAVYYCTRWLPMDYWGQGTSVTVSS
DNA VH	115	caggtccagctgcagcagtcaggagccgaactggtgcggcccggagcttctgtcaaactgag ctgcaaggcactgggctacaccttcacagactatgagatgcactgggtgaaacagacccccgt ccatggactggaatggatcggagcaattcaccctggaagcggaggagcagcttacatccaga agtttaaagggaaggcaactctgaccgccgacaagagctcctctacagcccatatggagctga gttcactgactagcgaagatagcgccgtgtactattgtacccgctggctgcctatggactattgg ggacaggggacttcagtgacagtgagttca
LCDR1 (Kabat)	116	KASDHINNWLA
LCDR2 (Kabat)	117	GATSLET
LCDR3 (Kabat)	118	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	119	SDHINNW
LCDR2 (Chothia)	120	GAT
LCDR3 (Chothia)	121	YLITPY
VL	122	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPG NAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLSITGLQTEDVA TYYCQQYLITPYTFGGGTKLEIK
VL de ADN	123	gatattcagatgacccagagtagttcttacctgagcgtgtccctgggaggaagggtcaccatca

		catgcaaggcaagcgaccacattaacaattggctggcctggtaccagcagaaaccaggaaac gcacctcgactgctgatcagcggagctacttccctggagaccggcgtgccctctagattctctg gaagtggctcagggaaggactatacactgagcattactggcctgcagaccgaagatgtcgcta catactattgtcagcagtacctgattacaccctacactttcggcggcggaactaaactggagatta ag

Otros anticuerpos de la invención incluyen aquellos en donde los aminoácidos o ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos se han mutado, pero tienen al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con las secuencias descritas en la Tabla 1. En algunas realizaciones ncluyen secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han mutado en las regiones variables, en compración con las regiones variables representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1, mientras se conserva sustancialmente la misma actividad de unión al antígeno.

Como cada uno de estos anticuerpos pueden unirse a LOX-1, VH, VL, cadena ligera de longitud completa, y las secuencias de cadena pesada de longitud completa (las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos) pueden "mezclarse y combinarse" para crear otros anticuerpos de unión a LOX-1 de la invención. Tales anticuerpos de unión a LOX-1 "mezclados y combinados" pueden ser probados utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica (por ejemplo, ELISAs, y otros ensayos descritos en la sección de Ejemplos). Con estas cadenas mezcladas y correspondidas, una secuencia VH a partir de un pareo VH/VL particular debe ser reemplazada por una secuencia VH estructuralmente similar. Del mismo modo una secuencia de cadena pesada de longitud completa a partir de un pareo de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa particular debe ser reemplazada por una secuencia de cadena pesada de longitud completa de estructura similar. Del mismo modo, una secuencia VL a partir de un pareo VH/VL particular debe ser reemplazada por una secuencia VL estructuralmente similar. Del mismo modo una secuencia de cadena ligera de longitud completa desde un pareo particular de cadena pesada de longitud completa /cadena ligera de longitud completa debe ser reemplazada por una secuencia de cadena ligera de longitud completa estructuralmente similar.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o región de unión al antígeno del mismo que tiene: un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74, y 94 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, y 104, en donde el anticuerpo se une específicamente a LOX-1 (por ejemplo, LOX-1 humano y de mono cynomolgus).

Más específicamente, en ciertos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo aislado o región de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas de SEC ID No: 14 y 24; 34 y 44; 54 y 64; 74 y 84; o 94 y 104, respectivamente.

En otro aspecto, la invención proporciona (i) un anticuerpo aislado que tiene: una cadena pesada de longitud completa que ha sido optimizada para expresión en una célula mamífera seleccionada del grupo que consta de SEQ ID Nos: 16, 36, 56, 76 o 96, y una cadena ligera de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha optimizado para expresión en una célula mamífera seleccionada del grupo que consta de SEQ ID Nos: 26, 46, 66, 86, o 106; o (ii) una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno del mismo. Más específicamente, en ciertos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo aislado o región de unión a antígeno del mismo que tiene una cadena pesada y una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas de SEC ID No: 14 y 24; 34 y 44; 54 y 64; 74 y 84; o 94 y 104, respectivamente.

Los términos “región determinante de complementariedad,” y “CDR”, como se utilizan en la presente se refieren a las secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables de anticuerpos que confieren especificidad de antígenos y afinidad de unión. En general, existen tres CDRs en cada región variable de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres CDRs en cada región variable de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

Los limites precisos de secuencias de aminoácidos de una CDR dada puede fácilmente determinarse utilizando cualquiera de un número de esquemas bien conocidos,

incluyendo aquellos descritos por Rabat. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración de "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (esquema de numeración "Chothia").

Por ejemplo, bajo Kabat, los residuos aminoácidos CDR del anticuerpo FF1 en el dominio variable de cadena pesada (VH) están enumerados 31-35 (HCDR1), 50-66 (HCDR2), y 99-104 (HCDR3); y los residuos aminoácidos CDR en el dominio variable de cadena ligera (VL) están enumerados 24-34 (CLDR1), 50-55 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3). Bajo Chothia los residuos aminoácidos CDR en la VH están enumerados 26-32 (HCDR1), 52-57 (HCDR2), y 99-104 (HCDR3); y los residuos aminoácidos en VL están enumerados 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2), y 91-96 (LCDR3). Al combinar las definiciones de CDR tanto de Kabat como de Chothia, las CDRs constan de residuos aminoácidos 26-35 (HCDR1), 50-66 (HCDR2), y 90-104 (HCDR3) en VH humano y residuos aminoácidos 24-34 (LCDR1), 50-55 (LCDR2), y 89-97 (LCDR3) en VL humano.

En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos de unión a LOX-1 que comprenden CDR1s, CDR2s y CDR3s de cadena pesada y cadena ligera como se describe en la Tabla 1, o combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1s VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, y 88. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s VH de los anticuerpos y se muestran en las SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, y 89. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 10, 30, 50, 70, y 90. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1s VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 18, 38, 58, 78, y 98. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, y 99. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80 y 100. Estas regiones CDR son delineadas utilizando el sistema de Kabat.

Alternativamente, como se define utilizando el sistema Chothia (Al-Lazikani, (1997) JMB 273,927-948), las secuencias de aminoácidos de las CDR1s VH de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NOs: 11, 31, 51, 71, y 91. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s VH de los anticuerpos y se muestran en las SEQ ID NOs: 12, 32, 52, 72, y 92. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s VH de los anticuerpos se

muestran en las SEQ ID NOs: 13, 33, 53, 73, y 93. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1s VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 21, 41, 61, 81, y 101. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 22, 42, 62, 82, y 102. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 23, 43, 63, 83, y 103.

Dado que cada uno de estos anticuerpos pueden fijarse a LOX-1 y que la especificidad de unión al antígeno es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias VH CDR1, 2 y 3 y las secuencias VL CDR1, 2 and 3 pueden ser “mezcladas y combinadas” (es decir, CDRs de diferentes anticuerpos pueden combinarse y mezclarse, aunque cada anticuerpo preferiblemente contiene una VH CDR1, 2 y 3 y una VL CDR1, 2 and 3 para crear otras moléculas de unión a LOX-1 de la invención. Tales anticuerpos de unión a LOX-1 "mezclados y combinados" pueden ser probados utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica y aquellos descritos en los Ejemplos (por ejemplo, ELISAs, SET, Biacore). Cuando las secuencias CDR VH se combinan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia VH particular debe reemplazarse por una o varias secuencias CDR estructuralmente similares. Del mismo modo, cuando las secuencias CDR VL se combinan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia VL particular debe reemplazarse por una o varias secuencias CDR estructuralmente similares. Será evidente para el experto que las secuencias VH y VL novedosas pueden crearse al sustituir una o más secuencias de regiones CDR VH y/o VL por secuencias estructuralmente similares a partir de las secuencias CDR mostradas en la presente para anticuerpos monoclonales de la presente invención. Además de lo anteror, en una realización, los fragmentos de unión a antígenos de los anticuerpos descritos en la presente pueden comprender una VH CDR1, 2, y 3, o una VL CDR 1, 2, y 3, en donde el fragmento se une a LOX-1 como un único domino variable.

En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden tener las secuencias de cadena pesada y ligera de los Fabs descritos en la Tabla 1. Más específicamente, el anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno del mismo pueden tener la secuencia pesada y ligera de Fab FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6.

En otras realizaciones de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos que especificamente se une a LOX-1 comprende una región variable de cadena pesada CDR1, una región variable de cadena pesada CDR2, una región variable de cadena pesada CDR3, una región variable de cadena ligera CDR1, una región variable de cadena ligera CDR2, y una región variable de cadena ligera CDR3 como lo define Kabat y se describe en la Tabla 1. En aún otras realizaciones de la invención el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos al que específicamente se une LOX-1 comprende una región variable de cadena pesada CDR1, una región variable de cadena pesada CDR2, una región varaible de cadena pesada CDR3, una región variable de cadena ligera CDR1, una región variable de cadena ligera CDR2, y una región variable de cadena ligera CDR3 como lo define Chothia y se describe en la Tabla 1.

En una realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 8; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 9; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 10; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 18; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 19; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 20.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 28; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 29; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 30; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 38; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 39; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 40.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 48; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 49; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 50; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 58; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 59; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 60.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 68; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 69; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 70; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 78; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 79; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 80.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 88; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 89; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 90; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 98; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 99; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 100.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 11; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 12; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 13; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 21; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 22; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 23.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 31; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 32; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 33; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 41; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 42; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 43.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 51; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID

NO: 52; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 53; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 61; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 62; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 63.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 71; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 72; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 73; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 81; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 82; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 83.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 91; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 92; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 93; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 101; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 102; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 103.

En ciertas realizaciones, la invención incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a LOX-1 como se describe en la Tabla 1. En una forma de realización preferida, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, que se une a LOX-1 es Fab FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6 .

Como se utiliza en la presente, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera o cadenas pesadas o ligeras de longitud completa que son "el producto de" o "se derivan a partir de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables o cadenas de longitud completa del anticuerpo se obtienen de un sistema que utiliza los genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen la inmunización de un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humanos con el antígeno de interés o la selección de una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana presentados en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva a partir de" una secuencia de

inmunoglobulina de línea germinal humana puede ser identificado como tal mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que está más cerca en secuencia (es decir, mayor % de identidad) con la secuencia del anticuerpo humano.

Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de origen natural o la introducción intencional de mutaciones sitio-dirigidas. Sin embargo, en las regiones variables VH o VL, un anticuerpo humano seleccionado normalmente es al menos 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal de ratón). En algunos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos 95%, o aún al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Típicamente, un anticuerpo humano recombinante mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos desde la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en las regiones variables VH o VL. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencias de aminoácidos desde la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Ejemplos de genes de inmunoglobulina de línea germinal incluyen, pero no se limitan a los fragmentos de línea germinal de dominio variable descritos más adelante, así como DP47 y DPK9.

Anticuerpos homólogos

En aún ora realización, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo que comprende secuencias de aminoácidos

que son homólogas a las secuencias descritas en la Tabla 1, y el anticuerpo se une a una proteína LOX-1 (por ejemplo, LOX-1 humano y cinomólogo), y retiene las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos descritos en la Tabla 1.

Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígenos funcional del mismo que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en donde el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de las SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74 o 94; el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 95%, 90%, o 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, o 104; y el anticuerpo se une específicamente a LOX-1 (por ejemplo, LOX-1 humano y de mono cynomolgus). En ciertos aspectos de la invención las secuencias de cadena pesada y ligera comprenden además secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tal como se define por Kabat, por ejemplo SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 18, 19, y 20, respectivamente. En ciertos aspectos de la invención las secuencias de cadena pesada y ligera comprenden además secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tal como se define por Chothia, por ejemplo SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 21, 22, y 23, respectivamente.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos VH y/o VL pueden ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias expuestas en la Tabla 1. En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos VH y/o VL pueden ser idénticas excepto por una sustitución de aminoácidos en no más de 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos. Un anticuerpo que tiene regiones VH y VL que tiene alta identidad (es decir., 80% o más) con las regiones VH y VL de aquellas descritas en la Tabla 1 puede obtenerse mediante mutagénesis (*ej.*, dirigida a sitio o mutagenesis mutagenesis mediada por PCR) de móleculas de ácido nucleico que codifican SEQ ID NOs: 15, 35, 55, 75, o 95 y SEQ ID NOs: 25, 45, 65, 85 o 105 respectivamente, seguido de pruebas del anticuerpo alterado codificado para la función retenida utilizando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa y/o de cadena ligera de longitud completa pueden ser 50% 60%, 70%,

80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias divulgadas en la Tabla 1. Un anticuerpo que tiene una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa que tiene alta identidad (*es decir.*, 80% o más) con las cadenas pesadas de longitud completa de cualquiera de las SEQ ID NOs : 16, 36, 56, 76, o 96, y cadenas ligeras de longitud completa de cualquiera de las SEQ ID NOs: 26, 46, 66, 86, o 106, pueden obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos, seguido de la prueba del anticuerpo alterado codificado para la función retenida utilizando ensayos funcionales descritos en el presente documento.

En otras realizaciones, las secuencias nucleotídicas de cadena pesada de longitud completa y/o de cadena ligera de longitud completa pueden ser al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias divulgadas en la Tabla 1.

En otras realizaciones, las regiones variables de cadena pesada y/o las regiones variables de secuencias nucleotídicas de cadena ligera pueden ser al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias divulgadas en la Tabla 1.

Como se usa en la presente, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el % de identidad es igual al número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de brechas, y la longitud de cada brecha, que es necesario introducir para alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden realizarse utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes a continuación.

Adicional o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente invención se puede utilizar como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda contra las bases de datos públicos para, por ejemplo, identificar las secuencias relacionadas. Por ejemplo, tales búsquedas se pueden realizar utilizando el programa BLAST (versión 2,0) de Altschul. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10.

Anticuerpos con Modificaciones Conservadoras

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención tiene una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de CDR tienen secuencias de aminoácidos especificadas basadas en los anticuerpos descritos en la presente o modificaciones conservadoras de las mismas, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos de unión a LOX-1 de la invención.

Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígenos, que consta de una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, en donde: La región variable de cadena pesada de secuencias de aminoácidos CDR1 se seleccionan a partir del grupo que consta de las SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, y 88, y las modificaciones conservativas de la misma; la región variable de cadena pesada de las secuencias de aminoácidos de CDR2 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID No: 9, 29, 49, 69, y 89, y modificaciones conservativas de la misma; la región variable de cadena pesada de secuencias de aminoácidos CDR3 se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID No: 10, 30, 50, 70, y 90 y las modificaciones conservativas de la misma; las regiones variables de cadena ligera de secuencias de aminoácidos CDR1 se seleccionan a partir del grupo que consiste en SEQ ID N º: 18, 38, 58, 78, y 98, y las modificaciones conservativas de la misma; la región variable de cadena ligera de las secuencias de aminoácidos de CDR2 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID No: 19, 39, 59, 79, y 99, y modificaciones conservativas de la misma; las regiones variables de cadena ligera de secuencias de aminoácidos CDR3 se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID No: 20, 40, 60, 80, y 100, y las modificaciones conservativas de la misma, y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a LOX-1.

En otras realizaciones, el anticuerpo de la invención se optimiza para expresión en una célula mamífera tiene una secuencia de cadena pesada de longitud completa y una secuencia de cadena ligera de longitud completa, en donde una o más de estas secuencias tienen secuencia aminoácidos especificadas basadas en los anticuerpos descritos en la presente o modificaciones conservadoras de las mismas, y en donde los anticuerpso

retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos de unión a LOX-1 de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo aislado optimizado para expresión en una célula mamífera que consta de una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa en donde la cadena pesada de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo de SEQ ID NOs: 16, 36, 56, 76, 96 y las modificaciones conservativas de la misma, y la cadena ligera de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo de la SEQ ID No: 26, 46, 66, 86, o 106; y modificaciones conservadoras de las mismas; y el anticuerpo se une específicamente a LOX-1 (por ejemplo, LOX-1 humano y de mono cynomolgus).

Anticuerpos que se unen al mismo epítopo

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítopo que los anticuerpos de unión a LOX-1 descritos en la Tabla 1. Por lo tanto, anticuerpos adicionales pueden identificarse con base en su capacidad para competir (ej., para inhibir competitivamente la unión de, en una forma estadísticamente significativa) con otros anticuerpos de la invención en ensayos de unión a LOX-1 (tal como los descritos en los Ejemplos). La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de anticuerpos de la presente invención a una proteína LOX-1 demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo por la unión a FOX-1; tal anticuerpo puede, de acuerdo con la teoría no limitante, unirse al mismo epítopo o un epítopo relacionado (por ejemplo, estructuralmente similar o espacialmente próximo) con la proteína LOX-1 como el anticuerpo con el que compite. En una cierta realización, el anticuerpo que se une al mismo epítopo en LOX-1 como los anticuerpos de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse como se describe en la presente. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo "compite" por la unión cuando el anticuerpo competidor inhibe la unión a LOX-1 de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención en más de un 50% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) en presencia de una concentración equimolar de anticuerpo competidor.

En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención se unen al dominio tipo lectina del extremo C de LOX-1 (dominio de unión a LDL-ox), más específicamente a un epítopo que comprende los residuos aminoácidos 228 a 246 de LOX-1 humano (FRVRGAVSQTYPSGTCAYI; SEC ID No: 3). En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención se unen a un epítopo en LOX-1 humano que comprende los residuos de aminoácidos Arg229 y Arg231 de LOX-1 humano (SEC ID No: 1).

Anticuerpos diseñados y modificados

Un anticuerpo de la invención también se puede preparar usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias VH y/o VL mostradas en la presente como material de partida para diseñar un anticuerpo modificado, el cual puede tener propiedades modificadas con respecto al anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede diseñarse mediante la modificación de uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, VH y/o VL), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones variables. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse mediante la modificación de los residuos dentro de la(s) región(es) constante(s), por ejemplo para alterar la(s) función(es) efectora(s) del anticuerpo.

Un tipo de modificación de región variable que puede realizarse es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cadenas pesadas y ligeras. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDRs son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDRs. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos específicos de origen natural mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR a partir del anticuerpo específico de origen natural injertado en secuencias variables de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (ver, por ejemplo, Riechmann, (1998) Nature 332:323-327; Jones, (1986) Nature 321:522-525; Queen, (1989) Proc. Natl. Acad.,

EE.UU. 86:10029-10033; Patente de EE.UU. No 5.225.539 de Winter, y patentes de EE.UU. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 otorgadas Queen *et al.*)

En consecuencia, otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígenos del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEQ ID NO: 8, 28, 48, 68, y 88; secuencias CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 9, 29, 49, y 69, y 89; las secuencias CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 10, 30, 50,70, y 90 respectivamente, y una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 18, 38, 58, 78, y 98; secuencias CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 19, 39, 59,79, y 99; y las secuencias CDR3 que constan de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, y 100 respectivamente. Así, tales anticuerpos contienen las secuencias CDR VH y VL de anticuerpos monoclonales, pero pueden contener diferentes secuencias variables a partir de estos anticuerpos.

Tales secuencias variables pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para genes de región variable de cadena pesada y ligera humana pueden encontrarse en la base de datos de secuencias de línea germinal humana "VBase" (disponible en el sitio web mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, E. A., *et al.*, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Publicación NIH No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.*, 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox, J. P. L. *et al.*, 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836; los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan expresamente en la presente como referencia.

Un ejemplo de secuencias variables para su uso en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias variables utilizadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, secuencias de consenso y/o secuencias variables utilizadas por los anticuerpos monoclonales de la invención. Las secuencias de CDR1, 2 y 3 VH, y las secuencias de CDR1, 2 y 3 VL, pueden injertarse en

regiones variables que tienen la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de inmunoglobulina de línea germinal de donde se deriva la secuencia variable, o las secuencias de CDR pueden injertarse en regiones variables que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos, es beneficioso mutar los residuos dentro de las regiones variables para mantener o mejorar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (véase, por ejemplo, Patentes de EE.UU. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen). 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 otorgadas a Queen). Estructuras que pueden utilizarse como andamiajes sobre las cuales se construyen los anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a VH1A, VH1B, VH3, Vk1, Vl2, y Vk2 Estructuras adicionales se conocen en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo en la base de datos VBase en la pagina web at vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?&MMN_position=1:1.

En consecuencia, otra realización de la invención se refiere a anticuerpos aislados de unión a LOX-1, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEQ ID NO: 14, 34, 54,74, o 94 o una secuencia de aminoácidos que tienen una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones, o adiciones de aminoácidos en la región variable de tales secuencias, y que comprende además una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, 104, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en la región marco de tales secuencias.

Otro tipo de modificación de región variable es mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VH y/o VL para mejorar con ello una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés, conocidas como "maduración de afinidad". Mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR se puede realizar para introducir la(s) mutación(es) y el efecto sobre la unión de anticuerpos, u otra propiedad funcional de interés, pueden evaluarse en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en la presente y se proporciona en los Ejemplos. Modificaciones conservativas (como se discutió anteriormente) se pueden introducir. Las mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos, adiciones o supresiones. Además,

típicamente no más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR se alteran.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona anticuerpos aislados de unión a LOX-1, o fragmentos de unión a antígenos de los mimos, que constan de una región variable de cadena pesada que tiene una región CDR1 VH que consta de una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que tiene SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, y 88 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEC ID No: 8, 28, 48, 68;, y 88; una región CDR2 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, y 89 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEC ID No: 9, 29, 49, 69, y 89; una región CDR3 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 10, 30, 50, 70 y 90, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 10, 30, 50,70, y 90; una región CDR1 VL que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID NO: 18, 38, 58, 78 y 98, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 18, 38, 58,78, y 98; una región CDR2 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID NO: 19, 39, 59, 79 y 99, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 19, 39, 59,79, y 99; una región CDR3 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID NO: 20, 40, 60, 80 y 100, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 20, 40, 60, 80, y 100.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona anticuerpos aislados de unión a LOX-1, o fragmentos de unión a antígenos de los mimos, que constan de una región variable de cadena pesada que tiene una región CDR1 VH que consta de una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que tiene SEQ ID NOs: 11, 31, 51, 71, y 91 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEC ID No:

11, 31, 51, 71;, y 91; una región CDR2 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 12, 32, 52, 72, y 92 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEC ID No: 12, 32, 52, 72, y 92; una región CDR3 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 13, 33, 53, 73 y 93, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 13, 33, 53,73, y 93; una región CDR1 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID NO: 21, 41, 61, 81 y 101, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 21, 41, 61, 81, y 101; una región CDR2 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID NO: 22, 42, 62, 82 y 102, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 22, 42, 62,82, y 102; y una región CDR3 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID NO: 23, 43, 63, 83 y 103, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 23, 43, 63, 83, y 103.

Injerto de Dominios de Unión al Antígeno en los Marcos o Andamios Alternativos

Una amplia variedad de estructuras o andamiajes de anticuerpos/inmunoglobulina pueden emplearse siempre y cuando el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que específicamente se una a LOX-1. Tales estructuras o andamiajes incluyen los 5 idiotipos principales de inmunoglobulinas humanas, o fragmentos de los mismos, e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, preferiblemente que tienen aspectos humanizados. Anticuerpos únicos de cadena pesada tales como los identificados en los camélidos son de interés particular en este aspecto. Nuevas estructuras, andamiajes y fragmentos siguen descubriéndose y desarrollándose por los expertos en la técnica.

En un aspecto, la invención se refiere a la generación de anticuerpos no basados en inmunoglobulinas utilizando andamios no inmunoglobulinos en los que las CDRs de la invención pueden injertarse. Estructuras y andamiajes no inmunoglobulinos conocidos o futuros se pueden emplear, siempre que comprendan una región de unión específica para la proteína LOX-1 diana. Marcos o andamios no inmunoglobulinos conocidos incluyen, pero no están limitados a, fibronectina (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd., Cambridge, MA y Ablynx nv, Zwijnaarde, Bélgica), lipocalina (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), inmuno-farmacéuticos modulares pequeños (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc., Mountain View, CA), Proteína A (Affibody AG, Suecia), y afilina (gamma-cristalina o ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

Los andamiajes de fibronectina se basan en el dominio tipo III de fibronectina (por ejemplo, el décimo módulo de fibronectina tipo III (dominio 10 Fn3)). El dominio de fibronectina tipo III tiene 7 u 8 hebras beta las cuales están distribuidas entre dos láminas beta, que se empaquetan entre sí para formar el núcleo de la proteína, y otras que contienen bucles (análogos a CDRs) que conectan las hebras beta entre sí y están expuestos a solventes. Existen por lo menos tres bucles de este tipo en cada borde del sándwich de lámina beta, donde el borde es la frontera de la proteína perpendicular a la dirección de las hebras beta (véase EE.UU. 6.818.418). Estos andamios basados en fibronectina no son una inmunoglobulina, aunque el pliegue global está estrechamente relacionado con el del fragmento de anticuerpo funcional más pequeño, la región variable de la cadena pesada, que comprende la unidad de reconocimiento del antígeno completo en IgG de camello y llama. Debido a esta estructura, el anticuerpo no inmunoglobulina imita las propiedades de unión a antígeno que son similares en naturaleza y afinidad a las de los anticuerpos. Estos andamios se pueden utilizar en una aleatorización de bucle y estrategia de barajado in vitro que es similar al proceso de maduración de afinidad de anticuerpos in vivo. Estas moléculas basadas en fibronectina pueden usarse como andamios en donde las regiones del bucle de la molécula pueden ser reemplazadas con CDRs de la invención usando técnicas de clonación estándar.

La tecnología anquirina se basa en el uso de proteínas con módulos de de repetición derivados de anquirina como andamios para soportar regiones variables que se pueden utilizar para la unión a diferentes dianas. El módulo de repetición de anquirina es

un polipéptido de 33 aminoácidos que consta de dos α-propelentes anti-paralelos y un β-giro. La unión de las regiones variables está optimizada principalmente mediante el uso de representación de ribosomas.

Los avímeros se derivan a partir de proteína que contiene dominio A tales como LRP-1. Estos dominios se utilizan por naturaleza para las interacciones proteína-proteína y en humanos en más de 250 proteínas se basan estructuralmente en dominios A. Los avimeros constan de un número de diferentes monomeros de "dominio-A" (2-10) ligados a través de enlazadores de aminoácidos. Pueden crearse avimeros que pueden unirse al antígeno diana utilizando la metodología descrita en, por ejemplo, la solicitud de EE.UU. Publicación de Patente Nos. 20040175756; 20050053973; 20050048512 y 20060008844.

Los ligandos de afinidad de aficuerpos son pequeñas proteínas simples compuestas de un conjunto de tres propelentes basado en el andamio de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A. La proteína A es una proteína de superficie de la bacteria Staphylococcus aureus. Este dominio andamio consta de 58 aminoácidos, 13 de los cuales son asignados al azar para generar bibliotecas de aficuerpo con un gran número de variantes de ligandos (Véase, por ejemplo, EE.UU. 5.831.012). Las moléculas de aficuerpo imitan anticuerpos, tienen un peso molecular de 6 kDa, en comparación con el peso molecular de los anticuerpos, que es de 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de unión de moléculas de aficuerpo es similar a la de un anticuerpo.

Las anticalinas son productos desarrollados por la empresa Pieris ProteoLab AG. Son derivados de lipocalinas, un amplio grupo de proteínas pequeñas y robustas que están normalmente implicadas en el transporte o el almacenamiento fisiológico de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Varias lipocalinas naturales ocurren en los tejidos humanos o líquidos corporales. La arquitectura de la proteína es una reminiscencia de inmunoglobulinas, con bucles hipervariables en la parte superior de un marco rígido. Sin embargo, en contraste con los anticuerpos o sus fragmentos recombinantes, las lipocalinas se componen de una única cadena polipeptídica con 160 a 180 residuos de aminoácidos, siendo sólo ligeramente más grande que un único dominio de inmunoglobulina. El conjunto de cuatro bucles, que constituye el bolsillo de unión, muestra la plasticidad estructural pronunciada y tolera una variedad de cadenas laterales. El sitio de unión puede así reconfigurarse en un proceso patentado con el fin de reconocer las moléculas diana prescritas de forma diferente con alta afinidad y especificidad. Una proteína de la familia

lipocalina, la proteína de unión a Bilin (BBP) de Pieris Brassicae ha sido utilizada para desarrollar anticalinas por mutagénesis de la serie de cuatro bucles. Un ejemplo de una solicitud de patente que describe anticalinas está en la publicación PCT No WO 199916873.

Las moléculas de afilina son pequeñas proteínas no inmunoglobulina que están diseñadas para afinidades específicas hacia las proteínas y moléculas pequeñas. Nuevas moléculas de afilina pueden seleccionarse muy rápidamente a partir de dos bibliotecas, cada una de los cuales está basada en una proteína de andamiaje derivada de ser humano diferente. Las moléculas de afilina no muestran ninguna homología estructural con proteínas de inmunoglobulina. En la actualidad, dos andamios de afilina se emplean, uno de los cuales es cristalino gamma, una proteína del cristalino estructural humano y el otro son las proteínas de la superfamilia "ubiquitina". Ambos andamios humanos son muy pequeños, muestran una estabilidad a alta temperatura y son casi resistentes a los cambios de pH y agentes desnaturalizantes. Esta alta estabilidad es principalmente debida a la estructura de lámina beta expandida de las proteínas. Ejemplos de proteínas derivadas de cristalinas gamma se describen en WO200104144 y ejemplos de proteínas tipo "ubiquitina "se describen en WO2004106368.

Miméticos de epítopo proteicos (PEM) son moléculas cíclicas tipo péptido de tamaño medio (MW 1-2 kDa) que imitan las estructuras beta-horquilla secundarias de las proteínas, la estructura secundaria importante implicada en interacciones proteína-proteína.

La presente invención proporciona anticuerpos completamente humanos que específicamente se unen a una proteína LOX-1. En comparación con los anticuerpos quiméricos o humanizados, los anticuerpos humanos de unión a LOX-1 de la invención tienen antigenicidad adicionalmente reducida cuando se administran a sujetos humanos.

Anticuerpos camélidos

Proteínas de los anticuerpos obtenidos de los miembros de la familia del camello y dromedario (Camelus bactrianus y Calelus dromaderius) incluyendo a los miembros del nuevo mundo, como especies de llama (Lama paccos, Lama glama y Lama Vicugna) se

han caracterizado con respecto al tamaño, complejidad estructural y antigenicidad para sujetos humanos. Ciertos anticuerpos IgG de esta familia de mamíferos que se encuentran en la naturaleza carecen de cadenas ligeras, y por tanto son estructuralmente distintos de la estructura cuaternario de cuatro cadenas típica que tiene dos cadenas ligeras y dos pesadas, para los anticuerpos de otros animales. Ver PCT/EP93/02214 (WO 94/04678 publicada el 3 de marzo de 1994).

Una región del anticuerpo de camélido que es el dominio variable único pequeño identificado como VHH se puede conseguir mediante ingeniería genética para producir una proteína pequeña que tiene alta afinidad para una diana, lo que resulta en una proteína derivada de anticuerpo de bajo peso molecular conocida como un "nanocuerpo camélido ". Veáse patente EE.UU. No. 5,759,808 presentada en Junio 2, 1998; veáse también Stijlemans, B., 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M. 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. *et al.* 2002 Int J Cancer 89: 456-62; Pleschberger, M. 1998 EMBO J 17: 3512-3520. Bibliotecas modificadas de anticuerpos camelidos y fragmentos de anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, en Ablynx, Ghent, Belgica. Al igual que con otros anticuerpos de origen no humano, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de camélido puede alterarse de manera recombinante para obtener una secuencia que se asemeja más a una secuencia humana, es decir, el nanocuerpo puede ser "humanizado". Así, la antigenicidad natural baja de anticuerpos de camélidos para los seres humanos puede reducirse aún más.

El nanocuerpo camélido tiene un peso molecular de aproximadamente una décima parte de una molécula de IgG humana, y la proteína tiene un diámetro físico de sólo unos pocos nanómetros. Una consecuencia del pequeño tamaño es la capacidad de nanocuerpos camélidos de unirse a sitios antigénicos que son funcionalmente invisibles para proteínas de anticuerpo más grandes, es decir, nanocuerpos camélidos son útiles como reactivos de detección de los antígenos que son de otra manera crípticos utilizando técnicas inmunológicas clásicas, y como posibles agentes terapéuticos . Así, otra consecuencia del pequeño tamaño es que un nanocuerpo camélido puede inhibir como resultado de la unión a un sitio específico en una ranura o estrecha hendidura de una proteína diana, y por lo tanto puede servir en una capacidad que se asemeja más a la función de un fármaco de bajo peso molecular clásico que la de un anticuerpo clásico.

El bajo peso molecular y tamaño compacto resultan además en que los nanocuerpos camélidos son extremadamente termoestables, estable al pH extremo y a la digestión proteolítica, y deficientemente antigénica. Otra consecuencia es que los nanocuerpos camélidos se mueven fácilmente desde el sistema circulatorio a los tejidos, e incluso cruzan la barrera sangre-cerebro y pueden tratar trastornos que afectan al tejido nervioso. Los nanocuerpos pueden facilitar adicionalmente el transporte del fármaco a través de la barrera hematoencefálica. Véase la solicitud de patente EE.UU. 20040161738 publicado 19 de agosto 2004. Estas características combinadas con la baja antigenicidad a los seres humanos indican un gran potencial terapéutico. Adicionalmente, estas moléculas pueden ser totalmente expresadas en células procariotas tales como E. coli y se expresan como proteínas de fusión con bacteriófagos y son funcionales.

Por consiguiente, una característica de la presente invención es un anticuerpo o nanocuerpo camélido que tiene alta afinidad con LOX-1. En ciertas realizaciones en la presente, el anticuerpo o nanocuerpo camélido es producido de manera natural en el animal camélido, es decir, se produce por el camelido después de inmunización con LOX-1 o un fragmento peptídico del mismo, utilizando técnicas descritas en la presente para otros anticuerpos. Alternativamente, el nanocuerpo camélido de unión a LOX-1 es modificado, es decir, producido por selección, por ejemplo, a partir de una biblioteca de fagos que presentan adecuadamente proteínas de nanocuerpos camélidos mutagenizados que utilizan procedimientos de paneo con LOX-1 como una diana como se describe en los ejemplos en la presente. Los nanocuerpos modificados además se pueden personalizar mediante ingeniería genética para tener una vida media en un sujeto receptor entre 45 minutos y dos semanas. En una realización específica, el anticuerpo o nanocuerpo camélido se obtiene al injertar las secuencias CDRs de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos humanos de la invención en el nanocuerpo o secuencia variables de anticuerpos de dominio sencillo, como se describe por ejemplo en PCT/EP93/02214.

Moléculas Biespecíficas y Anticuerpos Multivalentes

En otro aspecto, la presente invención incluye moléculas biespecíficas o multiespecíficas que comprenden un anticuerpo de unión a LOX-1, o un fragmento del mismo, de la invención. El anticuerpo de la invención, o regiones de unión a antígenos

del mismo pueden derivatizarse o ligarse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor), para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión diferentes o moléculas diana. El anticuerpo de la invención pueden en realidad ser derivatizado o ligado a más de una molécula funcional para generar moléculas multi-específicas que se unen a más de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas diana; tales moléculas multi-específicas también pretenden ser incluidas por el término "molécula biespecífica" como se utiliza en la presente. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede ligarse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de tal manera que se produzca una molécula biespecífica.

Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para LOX-1 y una segunda especificidad de unión por un segundo epítopo diana. Por ejemplo, el segundo epítopo diana es otro epítopo de LOX-1 diferente del primer epítopo diana.

Adicionalmente, para la invención en la cual la molécula biespecífica es multi-específica, la molécula puede además incluir una tercera especificidad de unión, además del primero y segundo epítopos diana.

En una realización, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo un Fab, Fab', F(ab')2, Fv, o una cadena Fv sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o de cadena pesada, o cualquier fragmento mínima del mismo tal como un Fv o un constructo de cadena sencilla como se describió en Ladner Patente EE.UU. No. 4,946,778.

Los diacuerpos son moléculas bivalentes, biespecíficas en las cuales los dominios VH y VL se expresan sobre una única cadena polipeptídica, conectada por un enlazador que es demasiado corto para permitir pareo entre los dos dominios en la misma cadena. Los dominios VH y VL se parean con dominios complementarios de otra cadena, creando así dos sitios de unión a antígenos (veáse e.j., Holliger *et al.*, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak *et al.*, 1994 Structure 2:1121-1123). Los diacuerpos se

pueden producir mediante la expresión de dos cadenas de polipéptidos, ya sea con la estructura de VHA-VLB y VHB-VLA (configuración VH-VL), o VLA-VHB y VHA VLB-(configuración VL-VH) dentro de la misma célula. La mayoría de éstos se puede expresar en forma soluble en bacterias. Diacuerpos de cadena única (scDb) se producen mediante la conexión de las dos cadenas de polipéptidos formadoras de diacuerpos con enlazador de aproximadamente 15 residuos de aminoácidos (véase Holliger y Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(3-4):128-30; Wu *et al.*, 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36). scDb puede expresarse en bacterias en forma soluble, activa, monomerica (veáse Holliger y Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(34): 128-30; Wu *et al.*, 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36; Pluckthun y Pack, 1997 Immunotechnology, 3(2): 83-105; Ridgway, 1996 Protein Eng., 9(7):617-21). Un diacuerpo puede fusionarse a Fc para generar un "di-diacuerpo" (veáse Lu *et al.*, 2004 J. Biol. Chem., 279(4):2856-65).

Otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas pueden prepararse al conjugar las especificidades de unión componentes, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse de manera separada y luego conjugarse entre sí. Cunado las especificidades de unión son proteínas o péptidos, una variedad de agentes de acoplamiento o entre-cruzamiento pueden utilizarse para conjugación covalente. Ejemplos de agentes entrecruzantes incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5 '-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (OPDM), N- succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4 - (N-maleimidometil) ciclohexano-l-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky, (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, (1985) ProcNatl AcadSci EE.UU. 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) BehringIns. Mitt. No. 78.118:118-132; Brennan, (1985) Science 229:81-83), y Glennie, (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375). Agentes conjugantes son SATA y sulfo SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, estos pueden ser conjugados mediante la unión de sulfhidrilo a las regiones bisagra del extremo C de las dos cadenas

pesadas. En una realización particular, la región de bisagra se modifica para contener un número impar de residuos de sulfhidrilo, por ejemplo, uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F (ab ')$_2$ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena única que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en la patente EE.UU. número 5.260.203; patente EE.UU. número 5.455.030; patente de EE.UU. número 4.881.175; patente de EE.UU. número 5.132.405; patente de EE.UU. número 5.091.513; Número de patente de EE.UU. 5.476.786; patente de EE.UU. número 5.013.653; patente de EE.UU. número 5.258.498; y patente de EE.UU. número 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse mediante, por ejemplo, ensayo immunosorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (REA), análisis FACS, ensayo biológico (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o ensayo de Western Blot. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos anticuerpo-proteína de interés particular empleando un reactivo etiquetado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

En otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos multivalentes que comprenden al menos dos porciones de unión a antígenos idénticas o diferentes de los anticuerpos de la invención uniéndose a LOX-1. Las porciones de unión a antígenos pueden enlazarse juntas a través de fusión proteica o enlace covalente o no covalente. Alternativamente, los métodos de enlace se han descrito para las moléculas biespecíficas. Compuestos tetravalentes se pueden obtener por ejemplo por anticuerpos entrecruzados de los anticuerpos de la invención con un anticuerpo que se une a las regiones constantes de los anticuerpos de la invención, por ejemplo la región Fc o de bisagra.

Los dominios de trimerización se describen por ejemplo en la patente EP 1012280B1 Boreal. Los módulos de pentamerizición se describen por ejemplo en PCT/EP97/05897.

Anticuerpos con Vida Media Extendida

La presente invención proporciona anticuerpos que específicamente se unen a la proteína LOX-1 que tienen una vida media extendida *in vivo.*

Muchos factores pueden afectar la vida media de una proteína *in vivo*. Por ejemplo, la filtración renal, metabolismo en el hígado, degradación por enzimas proteolíticos (proteasas), y respuestas inmunogénicas (por ejemplo, la neutralización protéica por anticuerpos y absorción por macrófagos y células dendríticas). Una variedad de estrategias pueden utilizarse para extender la vida media de los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, mediante enlace químico a polietilenglicol (PEG), reCODE PEG, andamio de anticuerpos, ácido polisiálico (PSA), almidón de hidroxietilo (HES), ligandos de unión a albúmina, y placas de carbohidrato; por fusión genética a proteínas de unión a proteínas séricas, tales como albúmina, IgG, FcRn, y transferir; por acoplamiento (de manera genética o química) a otras fracciones de unión que se unen a las proteínas séricas, tales como nanocuerpos, Fabs, DARPins, avimeros, aficuerpos y anticalinas; por fusión genética a RPEG, albúmina, dominio de albúmina, proteínas de unión a albúmina y Fc, o por la incorporación en nanovehiculos, formulaciones de liberación lenta, o dispositivos médicos.

Para prolongar la circulación sérica de anticuerpos *in vivo*, moléculas poliméricas inertes tales como PEG de alto peso molécular pueden ser fijadas a los anticuerpos con o sin un enlazador multifuncional ya sea a través de conjugación específica a sitio del PEG al extremo N o C de los anticuerpos o a través de grupos épsilon-amino presentes en los residuos de lisina. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo o fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilénglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se adhieren al anticuerpo o fragmento del mismo. La pegilación puede realizarse por una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Tal como se utiliza en la presente, el término "polietilenglicol" se pretende que abarque cualquiera de las formas de PEG que han sido

utilizadas para derivatizar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi- o ariloxi polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a ser pegilado es un anticuerpo aglicosilado. Se puede utilizar derivatización de polímero lineal o ramificado que resulta en una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación puede ser estrechamente monitoreado por SDS-PAGE y espectrometría de masas para garantizar la conjugación apropiada de moléculas PEG al anticuerpo. PEG sin reaccionar se puede separar de anticuerpo-conjugados PEG mediante exclusión por tamaño o mediante cromatografía de intercambio iónico. Los anticuerpos derivados de PEG pueden probarse para la actividad de unión, así como para la eficacia in vivo utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante los inmunoensayos descritos en la presente. Métodos para proteínas de pegilación se conocen en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invencion. Véase por ejemplo, el documento EP 0 154 316 por Nishimura, Y EP 0 401 384 por Ishikawa).

Otras tecnologías de pegilación modificadas incluyen tecnología de modificación dirigida ortogonal químicamente reconstructiva (ReCODE PEG), que incorpora cadenas laterales químicamente definidas en proteínas biosintéticas a través de un sistema reconstituido que incluye ARNt sintetasa y ARNt. Esta tecnología permite la incorporación de más de 30 nuevos aminoácidos en las proteínas biosintéticas en células de *E. coli*, de levadura y mamíferas. El tRNA incorpora un aminoácido no nativo en cualquier lugar que un codón ámbar esté posicionado, convirtiendo el ámbar de un codón de parada a uno que indica la incorporación del aminoácido químicamente definido.

La tecnología de pegilación recombinante (rPEG) también se puede utilizar para la extensión de vida media sérica. Esta tecnología consiste en la fusión genética de cola de proteína no estructurada de 300-600 aminoácidos a la proteína farmacéutica existente. Debido a que el peso molécular aparente de dicha cadena de proteína no estructurada es aproximadamente 15 veces mayor que su peso molécular real, la vida media en suero de la proteína será mucho mayor. En contraste a la PEGilación tradicional, que requiere la conjugación química y repurificación, el proceso de fabricación se simplifica enormemente y el producto es homogéneo.

La polisialización es otra tecnología, que utiliza el polímero natural PSA para prolongar la vida activa y mejorar la estabilidad de los péptidos y proteínas terapéuticas. PSA es un polímero de ácido siálico (un azúcar). Cuando se utiliza para la administración

de proteínas y medicamentos peptídicos terapéuticos, el ácido polisiálico proporciona un microambiente protector sobre la conjugación. Esto aumenta la vida activa de la proteína terapéutica en la circulación y evita que sea reconocido por el sistema inmune. El polímero PSA se encuentra naturalmente en el cuerpo humano. Fue adoptado por ciertas bacterias que evolucionaron durante millones de años para recubrir las paredes de la misma. Estas bacterias naturalmente polisialilazadas fueron capaces, en virtud de mimetismo molécular, de frustrar el sistema defensivo del cuerpo. PSA, la tecnología de sigilo óptima de la naturaleza, puede producirse fácilmente a partir de dichas bacterias en grandes cantidades y con determinadas características físicas. PSA bacteriano es completamente no inmunogénico, incluso cuando se acopla a proteínas, ya que es químicamente idéntico al PSA en el cuerpo humano.

Otra tecnología incluye el uso de derivados de almidón de hidroxietilo ("HES") vinculados a los anticuerpos. HES es un polímero natural modificado derivado de almidón de maíz ceroso y puede ser metabolizado por las enzimas del cuerpo. Soluciones de HES se administran normalmente para sustituir el volumen de sangre deficiente y para mejorar las propiedades reológicas de la sangre. La hesilación de un anticuerpo permite la prolongación de la vida media en circulación al aumentar la estabilidad de la molécula, así como mediante la reducción de la depuración renal, lo que resulta en una actividad biológica aumentada. Mediante la variación de diferentes parámetros, tales como el peso molecular de HES, una amplia gama de conjugados de anticuerpos HES se pueden personalizar.

Anticuerpos que tienen una vida media aumentada *in vivo* también pueden generarse introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o supresiones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn del mismo (preferiblemente un fragmento de dominio de Fc bisagra o fragmento de dominio Fc) . Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N º WO 98/23289; Publicación Internacional N º WO 97/34631, y la patente estadounidense N º 6.277.375.

Además, los anticuerpos pueden conjugarse a albúmina (ej., albúmina de suero humano; HSA) con el fin de que los anticuerpos sean más estables *in vivo* o tengan una vida media *in vivo* más prolongada. Las técnicas son bien conocidas en el estado de la técnica, véase por ejemplo Publicación Internacional Nos. WO 93/15199, WO 93/15200,

y WO 01/77137; y Patente Europea No. EP 413,622. Además, en el contexto de un anticuerpo biespecífico como se describió anteriormente, las especificidades del anticuerpo pueden ser diseñadas de manera que el dominio de unión del anticuerpo se une a LOX-1 mientras un segundo dominio de unión del anticuerpo se une a la albúmina de suero, preferiblemente HSA.

Las estrategías para aumentar la vida media son especialmente útiles en nanocuerpos, aglomerantes basados en fibronectina, y otros anticuerpos o proteínas para los cuales se desea vida media in vivo aumentada.

Conjugados de Anticuerpos

La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a una proteína LOX-1 fusionada de manera recombinante o conjugada químicamente (incluyendo tanto conjugaciones covalentes como no covalentes) a una proteína o polipéptido heterólogo (o un fragmento del mismo, preferiblemente a un polipéptido de al menos 10 , al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. En particular, la invención proporciona proteínas de fusión que comprenden un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo descritos en la presente (por ejemplo, un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F (ab) $_2$, un dominio VH, un CDR VH, un dominio VL o un CDR VL) y una proteína heteróloga, polipéptido o péptido. Los métodos para fusionar o conjugar proteínas, polipéptidos, o péptidos a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Patente estadounidense Nos. 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851, y 5,112,946; Patente Europea Nos. EP 307,434 y EP 367,166; Publicación Internacional Nos. WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng, 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; y Vil, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337- 11341.

Proteínas de fusión adicionales pueden generarse a través de las técnicas de transposiciones genéticas, transposiciones de motivos, transposiciones de exones, y/o transposiciones de codones (denominados de manera colectiva “transposiciones de ADN”). Las transposiciones de ADN pueden emplearse para alterar las actividades de los

anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos con afinidades mayores y tasas de disociación menores). Véase, en general, las patentes estadounidense Nos. 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252, y 5,837,458; Patten, 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33; Harayama, (1998) Trends Biotechnol. 16 (2) :76-82; Hansson, (1999) J. Mol. Biol. 287:265-76, y Lorenzo y Blasco, (1998) Biotechniques 24 (2): 308 - 313 (cada una de estas patentes y publicaciones se incorporan en la presente como referencia en su totalidad). Los anticuerpos o fragmentos de los mismos, o los anticuerpos codificados o fragmentos de los mismos, pueden ser alterados al ser sometidos a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a una proteína LOX-1 puede ser recombinado con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc de una o más moléculas heterólogas.

Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc, 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz , (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86:821-824, por ejemplo, hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina de la influenza (Wilson, (1984) Cell 37:767), y la etiqueta "bandera".

En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos conjugados con un agente de diagnóstico o detectable. Tales anticuerpos pueden ser útiles para monitorear o pronosticar el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad o trastorno como parte de un procedimiento de ensayo clínico, tal como la determinación de la eficacia de una terapia particular. Tal diagnóstico y detección se puede lograr mediante el acoplamiento de los anticuerpos a sustancias detectables incluyendo, pero no limitando a, enzimas diversas, tales como, pero no limitadas a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o

acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero no se limitan a, streptavidinlbiotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no limitado a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina- fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero no limitado a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero no limitados a, luciferina, luciferasa y aecuorina, materiales radiactivos, tales como, pero no limitado a, yodo (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, y ^{121}I ,), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^{3}H), indio (^{115}In, ^{113}In, ^{112}In, ^{111}In y,), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Ti), galio (^{68}Ga, ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm, ^{177}Lu, ^{159}Gd, ^{149}Pm, ^{140}La, ^{175}Yb, ^{166}Ho, ^{90}Y, ^{47}Sc, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{142} Pr, ^{105}Rh, ^{97}Ru, ^{68}Ge, ^{57}Co, ^{65}Zn, ^{85}Sr, ^{32}P, ^{153}Gd, ^{169}Yb, ^{51}Cr, ^{54}mn, ^{75}Se, ^{113}Sn y ^{117}Tin y metales emisores de positrones que utilizan varias tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos.

La presente invención abarca además los usos de anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados con una fracción terapéutica. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse a una fracción terapéutica tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion de metal radiactivo, por ejemplo, emisores alfa. Un agente de citotoxina o citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células.

Además, un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse a una fracción terapéutica o fracción fármacologica que modifica una respuesta biológica dada. Las fracciones terapéuticas o fracciones fármacologicas no han de interpretarse como limitadas a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción farmacológica puede ser una proteína, péptido o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, toxina del cólera o toxina diftérica, una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, α-interferón, β-interferón, factor de crecimiento de nervios, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, un agente anti-angiogénico, o, un modificador de respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfoquina.

Además, un anticuerpo puede conjugarse a las fracciones terapéuticas tales como un ión metálico radioactivo, tal como emisores alfa tales como 213Bi o quelantes

macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos, incluyendo pero sin limitar a, 131In, 131LU, 131Y, 131Ho, 131Sm, a polipéptidos. En ciertas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N ', N'', N'''-tetraacético (DOTA) el cual puede conectarse al anticuerpo a través de una molécula de enlace. Tales moléculas de enlace son comúnmente conocidas en la técnica y se describen en Denardo, (1998) Clin Cancer Res. 4 (10) :2483-90; Peterson, (1999) Bioconjug. Chem. 10 (4) :553-7, y Zimmerman, (1999) Nucl. Med. Biol. 26 (8):943-50, cada uno incorporado como referencia en sus totalidadades.

Las técnicas para conjugar las fracciones terapéuticas con anticuerpos son bien conocidas, véase, *ej.*, Arnon, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58.

Los anticuerpos también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Métodos de Producción de Anticuerpos de la Invención

Ácidos Nucleicos que Codifican los Anticuerpos

La invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos sustancialmente purificadas que codifican polipéptidos que comprenden segmentos o dominios de cadenas del anticuerpo de unión al LOX-1 descrito anteriormente. Algunos de los ácidos nucleicos de la invención comprenden la secuencia nucleotídica que codifica la región

variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 15, 35, 55,75, 95 y/o la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera mostrada en la SEC ID No: 25, 45, 85, o 105. En una realización específica, las moléculas de ácidos nucleicos son aquellas identificadas en la Tabla 1. Algunas otras moléculas de ácidos nucleicos de la invención comprenden secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas (por ejemplo, al menos 65, 80%, 95%, o 99%) a las secuencias de nucleótidos de aquellas identificadas en la Tabla 1. Cuando se expresan a partir de vectores de expresión apropiados, los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos son capaces de exhibir una capacidad de unión al antígeno de LOX-1.

También se proporcionan en la invención polinucleótidos que codifican al menos una región CDR y generalmente todas las tres regiones CDR desde la cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo de unión al LOX-1 divulgado anteriormente. Algunos otros polinucleótidos codifican la totalidad o sustancialmente todas las secuencias de región variable de la cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo de unión a LOX-1 divulgado anteriormente. Debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácido nucleico codificarán cada una de las secuencias de amino ácidos de inmunoglobulina.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden codificar tanto una región variable como una región constante del anticuerpo. Algunas de las secuencias de aminoácidos de la invención comprenden nucleótidos que codifican una secuencia de cadena pesada que es sustancialmente idéntica (ej., al menos 80%, 90%, o 99%) a la secuencia de cadena pesada divulgada en SEQ ID NO: 16, 36, 56, 76, o 96 Algunas de las secuencias de aminoácidos que comprenden nucleótidos que codifican una secuencia de cadena ligera madura que es sustancialmente idéntica (ej., al menos 80%, 90%, o 99%) a la secuencia de cadena ligera divulgada en SEQ ID NO: 26, 46, 66, 86 or 106.

Las secuencias polinucleotídicas pueden ser producidas por síntesis de ADN de fase sólida de novo o mediante mutagénesis PCR de una secuencia existente (ej., secuencias como se describe en los Ejemplos a continuación) que codifica un anticuerpo de unión a LOX-1 o su fragmento de unión. Síntesis química directa de ácidos nucleicos puede realizarse por métodos conocidos en la técnica, tales como el método del fosfotriéster de Narang, (1979) Meth. Enzymol. 68:90; el método del fosfodiéster de Brown, Meth. Enzymol. 68:109, 1979; el método de la dietilfosforamidita de Beaucage,

(1981) Tetra. Lett, 22:1859; y el método de soporte sólido de la Patente estadounidense N º 4.458.066. La introducción de mutaciones en una secuencia de polinucleótidos por PCR puede realizarse como se describe en, por ejemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, Nueva York, Nueva York, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.* (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila, Nucleic Acids Res. 19:967, y Eckert, (1991) PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

También se proporciona en la invención, vectores de expresión y células huésped para la producción de los anticuerpos de unión a LOX-1 descritos anteriormente. Varios vectores de expresión pueden emplearse para expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas de anticuerpos de unión a LOX-1 o fragmentos de unión. Vectores de expresión tanto basados en virus como no virales pueden utilizarse para producir los anticuerpos en una célula hospedera mamífera. Vectores y sistemas no virales incluyen plásmidos, vectores episomales, típicamente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN, y cromosomas artificiales humanos (véase, por ejemplo, Harrington, (1997) Nat Genet 15:345). Por ejemplo, vectores no virales útiles para la expresión de los polinucleótidos de unión a LOX-1 y polipéptidos en células mamíferas (por ejemplo, humanas) incluyen pThioHis A, B y C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B y C, (Invitrogen, San Diego, CA), vectores MPSV, y muchos otros vectores conocidos en la técnica por expresar otras proteínas. Vectores virales útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, vectores basados en SV40, virus del papiloma, virus de Epstein Barr HBP, vectores de virus vaccinia y virus Semliki Forest (SFV). Véase, Brent, (1995) supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, y Rosenfeld, (1992) Cell 68:143, 1992.

La elección del vector de expresión depende de las células huésped deseadas en las cuales el vector se va a expresar. Típicamente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadoras) que están enlazadas operativamente a los polinucleótidos que codifican una cadena o fragmento de anticuerpo de unión a LOX-1. En algunas realizaciones, un promotor inducible es empleado para evitar la expresión de secuencias insertadas, excepto bajo condiciones de inducción. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, arabinosa, lacZ, promotor de la metalotioneína o un promotor de choque térmico. Cultivos de organismos transformados pueden ampliarse bajo condiciones de no inducción sin sesgar la población a secuencias

de codificación cuyos productos de expresión son mejor tolerados por las células huésped. Además de promotores, otros elementos reguladores también pueden ser necesitados o deseados para la expresión eficaz de una cadena o fragmento de anticuerpo de unión a LOX-1. Estos elementos incluyen típicamente un codón de iniciación ATG y un sitio de unión a ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficacia de la expresión puede ser aumentada por la inclusión de potenciadores apropiados al sistema celular en uso (véase, *ej.*, Scharf, Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; and Bittner *et al.*, Meth. Enzymol., 153:516, 1987). Por ejemplo, el potenciador SV40 o potenciador CMV pueden usarse para aumentar la expresión en células huésped mamíferas.

Los vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de secuencia de señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados por secuencias insertadas de anticuerpos de unión a LOX-1. Más a menudo, las secuencias insertadas de anticuerpos de unión a LOX-1 están ligadas a secuencias señal antes de su inclusión en el vector. Los vectores que se utilizan para recibir secuencias que codifican los dominios variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos de unión a LOX-1 algunas veces también codifican las regiones constantes o partes de la misma. Tales vectores permiten la expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes conduciendo así a la producción de anticuerpos intactos o fragmentos de los mismos. Típicamente, tales regiones constantes son humanas.

Las células huésped para albergar y expresar las cadenas de anticuerpos de unión a LOX-1 pueden ser procarióticas o eucarióticas. E. coli es un huésped procariótico útil para clonar y expresar los polinucleótidos de la presente invención. Otros huéspedes microbianos adecuados para utilizar incluyen bacilos, tales como Bacillus subtilis, y otras enterobacterias, tales como Salmonella, Serratia, y varias especies de Pseudomonas. En estos huéspedes procariotas, también se pueden fabricar vectores de expresión, que típicamente contienen secuencias de control de expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos estará presente, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp), un sistema promotor de beta-lactamasa, o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores típicamente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitios de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción. Otros microbios, tales como levadura, también pueden emplearse para expresar

polipéptidos de unión a LOX-1 de la invención. También pueden utilizare células de insecto en combinación con vectores de baculovirus.

En algunas realizaciones preferidas, las células hospederas mamíferas se utilizan para expresar y producir los polipéptidos de unión a LOX-1 de la presente invención. Por ejemplo, pueden ser bien sea una línea celular de hibridoma que expresa genes de inmunoglobulina endógena (ej., el clon de hibridoma de mieloma 1D6.C9 como se describe en los Ejemplos) o una línea celular mamífera que alberga un vector de expresión exógeno (ej., las células de mieloma SP2/0 ejemplificadas a continuación). Estos incluyen cualquier célula animal o humana mortal o normal o normal o inmortal anormal. Por ejemplo, un número de líneas de células huésped adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas se han desarrollado incluyendo líneas de células CHO, varias líneas de celulas COS, células HeLa, líneas de células de mieloma, células B e hibridomas transformados. Se discute el uso de cultivos de células tisulares mamíferas para expresar polipéptidos generalmente en, por ejemplo, Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, Nueva York, NY, 1987. Vectores de expresión para células hospederas mamíferas pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, y un potenciador (véase, por ejemplo, Queen, (1986) Immunol. Rev. 89:49-68), y sitios de procesamiento de información necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme a ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras transcripcionales. Estos vectores de expresión contienen generalmente promotores derivados de genes mamíferos o de virus mamíferos. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específico al tipo celular, específicos a la etapa, y/o modulables o regulables. Promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, el promotor de la metalotioneína, el promotor tardío principal de adenovirus constitutivo, el promotor dexametasona de MMTV, el promotor SV40, el promotor MRP polIII, el promotor MPSV constitutivo, el promotor inducible por tetraciclina de CMV (tal como el promotor temprano inmediato CMV humano), el promotor CMV constitutivo, y combinaciones potenciadoras del promotor conocidas en la técnica.

Métodos para la introducción de vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo en el tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para las células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o electroporación puede utilizarse para otros huéspedes celulares. (Véase en general Sambrook, , Supra). Otros

métodos incluyen, por ejemplo, electroporación, tratamiento con fosfato de calcio, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, policatión: conjugados de ácidos nucleicos, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión a la proteína estructural VP22 del virus del herpes (Elliot y O'Hare, (1997) Cell 88:223), agente potenciador de captación de ADN, y transducción ex vivo. Para producción de alto rendimiento a largo plazo, de proteínas recombinantes, expresión estable a menudo se desea. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable cadenas de anticuerpos de unión a LOX-1 o fragmentos de unión pueden prepararse utilizando vectores de expresión de la invención que contienen orígenes de replicación virales o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Tras la introducción del vector, las células pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento de células que expresan con éxito las secuencias introducidas en medios selectivos. Las células resistentes, transfectadas establemente se pueden proliferar usando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de célula.

Generación de Anticuerpos Monoclonales de la Invención

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) pueden producirse mediante un a variedad de técnicas incluyendo metodología convencional de anticuerpos monoclonales ej., la técnica de hibridización celular somática estándar de Kohler y Milstein, 1975 Natura 256: 495. Muchas técnicas para producir anticuerpos monoclonales pueden emplearse ej., transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

Sistemas animales para preparar hibridomas incluyen los sistemas murinos, de rata y de conejo. Producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. Protocolos y técnicas de inmunización y técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la técnica. Los socios de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión son también conocidos.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo murino monoclonal preparado como

se ha descrito anteriormente. ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se puede obtener a partir del hibridoma murino de interés y se puede modificar para que contenga secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) utilizando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden vincularse a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N º 4.816.567 concedida a Cabilly). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en una estructura humana usando métodos conocidos en la técnica. Véase *ej.*, Patente EE.UU. No. 5225539 concedida a Winter, y Patente EE.UU. Nos. 5530101; 5585089; 5693762 y 6180370 concedidas a Queen.

En una cierta realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra LOX-1 se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y ratones transcromosómicos incluyen ratones conocidos en la presente como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en este documento como "ratones Ig humanos".

El HuMAb mouse ® (Medarex, Inc.) contiene minisitios de genes de inmunoglobulinas humanas que codifican secuencias de inmunoglobulinas no reordenadas de cadena pesada (μ y γ) y de cadena ligera κ, junto con mutaciones sobre las cuales se puede actuar que inactivan los sitios endógenos de cadena μ y κ (véase, por ejemplo, Lonberg, (1994) Nature 368 (6474): 856-859). En consecuencia, los ratones muestran una disminución de expresión de IgM de ratón o κ, y en respuesta a la inmunización, los transgenes introducidos humanos de cadena pesada y ligera se someten a cambio de clase y mutación somática para generar hgGk monoclonal humano de alta afinidad (Lonberg et al., (1994) supra ; revisado en Lonberg, (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg y Huszar, (1995) Intern Rev. Immunol.13: 65-93, y Harding, F. and Lonberg, N., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas llevadas por tales ratones, se describe adicionalmente en Taylor, L. *et al.*, 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et at., 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuaillon, 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, 1994 J.

Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L, 1994 International Immunology 579-591; y Fishwild, D, 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851, los contenidos de todos se incorporan específicamente por referencia en su totalidad. Véase adicionalmente las patentes estadounidense 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; y 5,770,429; todas concedidas a Lonberg y Kay; Patente EE.UU. No. 5,545,807 concedidas a Surani; Publicación PCT Nos. WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas concedidas a Lonberg y Kay; y Publicación PCT No. WO 01/14424 to Korman.

En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención pueden producirse utilizando un ratón que lleva las secuencias de inmunoglobulina humana en los transgenes y transcromosomas tal como un ratón que lleva un transgén humano de cadena pesada y un transcromosoma humano de cadena ligera. Tales ratones, conocidos en la presente como "ratones KM", se describen en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 a Ishida.

Aún más, los sistemas alternativos de animales transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden utilizar para producir los anticuerpos de unión a LOX-1 de la invención. Por ejemplo, un sistema transgénico alternativo conocido como el XenoMouse (Abgenix, Inc.) se puede utilizar. Tales ratones se describen en ej., Patente EE.UU. No. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6, 150,584 y 6,162,963 a Kucherlapati.

Además, los sistemas alternativos de animales transcromosómicos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se puede utilizar para producir los anticuerpos de unión a LOX-1 de la invención. Por ejemplo, los ratones con un transcromosoma de cadena pesada humana y un trancromosoma de cadena ligera humana, conocidos como "ratones TC" pueden utilizarse; tales ratones se describen en Tomizuka , (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97:722-727. Además, vacas que llevan transcromosomas humanos de cadena pesada y ligera se han descrito en la técnica (Kuroiwa et al., (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) y se pueden utilizar para producir los anticuerpos de unión a LOX-1 de la invención.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar usando métodos de presentación en fagos para la selección de bibliotecas de

genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos son establecidos en la técnica o se describen en los ejemplos a continuación. Véase, por ejemplo: Patentes EE.UU. Nos 5,223,409; 5,403,484; y 5,571,698 concedidas a Ladner; Patentes EE.UU. Nos. 5,427,908 y 5,580,717 concedidas a Dower; Patentes EE.UU. Nos. 5.969.108 y 6.172.197 concedidas a McCafferty; Patentes EE.UU. Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 y 6,593,081 otorgadas a Griffiths.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar usando ratones SCID en los cuales las células inmunes humanas se han reconstituido tal que una respuesta de anticuerpos humanos puede generarse tras la inmunización. Tales ratones se describen en ej., Patentes EE.UU. No. 5,476,996 y 5,698,767 concedidas a Wilson.

Modificación genética de regiones Variables FW o Fc

Los anticuerpos genéticamente modificados de la invención incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones a residuos variables dentro de VH y/o VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente tales modificaciones de regiones variables están hechas para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en "retro mutar" uno o más residuos de región variable a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sido objeto de mutación somática puede contener residuos variables que difieren de la secuencia de línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Tales residuos pueden ser identificados mediante la comparación de las secuencias de región variable de anticuerpos con las secuencias de línea germinal de las que se deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región variable a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser "retromutadas" a la secuencia de la línea germinal, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio. Tales anticuerpos "retromutados" también pretenden ser contemplados por la invención.

Otro tipo de modificación genética de región marco implica la mutación de uno o más residuos dentro de la región marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epítopos de células T para disminuir así la inmunogenicidad potencial del

anticuerpo. Este enfoque también se conoce como "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de patente de EE.UU. No. 20030153043 por Carr.

Además o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro de las regiones marco o CDR, los anticuerpos de la invención pueden ser diseñados para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media en suero, fijación del complemento, unión al receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede ser modificado químicamente (por ejemplo, una o más fracciones químicas se pueden unir al anticuerpo) o se puede modificar para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe en más detalle a continuación. La numeración de los residuos en la región Fc es del índice EU de Kabat.

En una realización, la región de bisagra de CH1 puede ser modificada de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, se aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de EE.UU. No. 5.677.425 por Bodmer. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región de bisagra Fc de un anticuerpo es mutada para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones aminoácidas se introducen en la región de interfaz de dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra de tal manera que el anticuerpo queda con una unión defectuosa a SpA (proteína estafilocóccica A) con relación a la unión nativa de SpA con el dominio Fc-bisagra. Este enfoque se describe en detalle adicional en la Patente EEUU. No. 6.165.745 por Ward.

En otra realización, el anticuerpo puede ser modificado para aumentar su vida media biológica. Diversos enfoques son posibles. Por ejemplo, una o más de las siguientes mutaciones pueden ser introducidas: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de EE.UU. N º 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la vida media biológica, el anticuerpo puede ser alterado dentro de la región CH1 o CL para contener un epítopo de unión al receptor silvestre tomado de dos bucles de un dominio

CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en la patente de EE.UU. Nos. 5,869,046 y 6,121,022 por Presta.

En aún otras realizaciones, la región Fc puede ser alterada mediante la sustitución de al menos un residuo aminoácido por un residuo aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden ser sustituidos por un residuo aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada para un ligando efector pero retenga la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector al que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en detalle en las Patentes EE.UU. No. 5,624,821 y 5,648,260, ambas por Winter.

En otra realización, uno o más aminoácidos seleccionados a partir de residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un residuo de aminoácido diferente tal que el anticuerpo tenga unión unión de C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) abolida y/o disminuida. Este enfoque se describe adicionalmente en detalle en las Patentes EE.UU. No. 6,194,551 por Idusogie.

En otra realización, uno o más residuos de aminoácidos se pueden alterar para alterar la capacidad del anticuerpo para fijarse al complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351 por Bodmer.

En aún otra realización, la región Fc puede ser modificada para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ mediante la modificación de uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072 por Presta. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRl, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han mapeado y variantes con unión mejorada se han descrito (véase Shields et al., (2001) J. Biol. Chen. 276:6591-6604).

En aún otra realización, la glicosilación de un anticuerpo es modificada. Por ejemplo, un anticuerpo aglicosilado puede fabricarse (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede ser alterada, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el “antígeno”. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden

lograr, por ejemplo, mediante la alteración de uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpos. Por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos pueden realizarse que resulten en la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región variable para eliminar así la glicosilación en dicho sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Este enfoque se describe adicionalmente en detalle en las Patentes EE.UU. No. 5.714.350 y 6.350.861 por Presta.

Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede ser hecho que tenga un tipo de alteración de la glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosil o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNAc de bisección aumentada. Tales patrones de glicosilación alterados han demostrado que aumentan la capacidad de ADCC de anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células huésped para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención para producir con ello un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 por Hang, describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, que codifica una fucosiltransferasa, de tal manera que los anticuerpos expresados en tal línea celular exhiben hipofucosilación. La publicación PCT WO 03/035835 por Presta describe una línea celular CHO variante, células Lecl3, con una capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos unidos por Asn (297), resultando también en hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields et al ., (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La publicación PCT WO 99/54342 por Umana et al. describe líneas celulares modificadas genéticamente para expresar glicosil transferasas modificadoras de glicoproteínas (por ejemplo, beta (1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas presenten estructuras de GlcNAc de bisección aumentada que resulta en actividad ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana et al., (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

Métodos para Modificar Anticuerpos Alterados

Como se discutió anteriormente, los anticuerpos de unión a LOX-1 que tienen secuencias VH y VL o secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa mostradas en la presente pueden utilizarse para crear nuevos anticuerpos de unión a LOX-1 mediante la modificación de las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de longitud completa, secuencias VH y/o VL, o la región constante unida a las mismas. Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se utilizan las características estructurales de un anticuerpo de unión a LOX-1 de la invención para crear anticuerpos estructuralmente relacionados de unión a LOX-1 que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tales como la unión a LOX-1 humana y también la inhibición de una o más propiedades funcionales de LOX-1 (por ejemplo, inhiben la unión de LOX-1 al receptor de LOX-1, inhiben la proliferación celular dependiente de LOX-1).

Por ejemplo, una o más regiones CDR de los anticuerpos de la presente invención, o mutaciones de los mismos, se pueden combinar de forma recombinante con regiones de estructura conocida y / o otros CDR para crear de forma recombinante por ingeniería, anticuerpos adicionales de unión a LOX-1 de la invención, como se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen aquellas descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de modificación es una o más de las secuencias VH y/o VL proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo manipulado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tiene una o más secuencias VH y/o VL proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. Más bien, la información contenida en la(s) secuencia(s) se utiliza como material de partida para crear una secuencia de "segunda generación" derivada de la secuencia original (s) y luego las secuencias de "segunda generación" se preparan y expresan como una proteína.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo de unión a LOX-1 que consta de una secuencia de anticuerpos de región variable de cadena pesada que tiene una secuencia CDR1 seleccionada a partir del grupo que consta de SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, y 88, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, y 89, y/o una secuencia CDR3 seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 10, 30, 50 y 70, y 90; y una secuencia de anticuerpos de región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de CDR1 seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 18, 38, 58, 78, y 98, una

secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, y 99, y/o una secuencia CDR3 seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, y 100; alterar al menos un residuo aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpos de región variable de cadena pesada y / o la secuencia de anticuerpos de región variable de cadena ligera para crear al menos una secuencia alterada de anticuerpos, y expresar la secuencia alterada de anticuerpos como una proteína.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo de unión a LOX-1 que consta de una secuencia de anticuerpos de región variable de cadena pesada que tiene una secuencia CDR1 seleccionada a partir del grupo que consta de SEQ ID NOs: 11, 31, 51, 71, y 91, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 12, 32, 52, 72, y 92, y/o una secuencia CDR3 seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 13, 33, 53 y 73, y 93; y una secuencia de anticuerpos de región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de CDR1 seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 21, 41, 61, 81, y 101, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 22, 42, 62, 82, y 102, y/o una secuencia CDR3 seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 23, 43, 63, 83, y 103; alterar al menos un residuo aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpos de región variable de cadena pesada y / o la secuencia de anticuerpos de región variable de cadena ligera para crear al menos una secuencia alterada de anticuerpos, y expresar la secuencia alterada de anticuerpos como una proteína.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo de unión a LOX-1 optimizado para expresión en una célula mamífera que consta de: una secuencia de anticuerpos de cadena pesada de longitud completa que tiene una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NOs: 16, 36, 56, 76 o 96; y una secuencia de anticuerpos de cadena ligera de longitud completa que tiene una secuencia seleccionada del grupo de 26, 46, 66, 86, o 106; alterando al menos un residuo aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpos de cadena pesada de longitud completa y/o la secuencia de anticuerpos de cadena ligera de longitud completa para crear al menos una secuencia alterada de anticuerpos; y expresar la secuencia alterada de anticuerpos como una proteína. En una realización, la alteración de la cadena pesada o ligera está en la región variable de la cadena pesada o ligera.

La secuencia alterada de anticuerpos también se puede preparar al seleccionar bibliotecas de anticuerpos que tienen secuencias CDR3 fijas o determinantes de unión esenciales como se describe en US2005/0255552 y diversidad en las secuencias CDR1 y CDR2. La selección se puede realizar de acuerdo con cualquier tecnología de selección adecuada para selección de anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos, tales como tecnología de presentación en fagos.

Las técnicas estándar de biología molecular se pueden utilizar para preparar y expresar la secuencia alterada de anticuerpos. El anticuerpo codificado por la secuencia de anticuerpos alterada es aquel que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos de unión a LOX-1 descritos en la presente, tales propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a, unión específica a LOX-1 humano, de cinomolgus, de rata y/o de ratón y el anticuerpo inhibe la proliferación celular dependiente de LOX-1 en un ensayo de proliferación de células F36E y/o Ba/F3-LOX-1R.

Y En ciertas realizaciones de los métodos de modificación de anticuerpos de la invención, se pueden introducir mutaciones al azar o selectivamente a lo largo de toda o parte de una secuencia de codificación de anticuerpos de unión a LOX-1 y los anticuerpos de unión a LOX-1 resultantes modificados pueden ser clasificados para la actividad de unión y/o otras propiedades funcionales como se describe en la presente. Métodos mutacionales se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 de Short describe métodos para la creación y selección de mutaciones de anticuerpos por medio de mutagénesis de saturación, montaje de ligación sintética, o una combinación de los mismos. Alternativamente, la publicación PCT WO 03/074679 por Lazar describe métodos de uso de métodos computacionales de detección para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos se han modificado para retirar sitios de deamidación. La deaminación se conoce por producir cambios estructurales y funcionales en un péptido o proteína. La deaminación puede resultar en bioactividad disminuida, así como en alteraciones en farmacocinética y antigenicidad de la proteína farmacéutica. (*Anal Chem*. 2005 Mar 1;77(5):1432-9).

En ciertas formas de realización de la invención, los anticuerpos han sido diseñados para aumentar el pI y mejorar sus propiedades tipo fármacos. El pI de una proteína es un factor determinante clave de las propiedades biofísicas generales de una molécula. Los anticuerpos que tienen pIs bajos han sido conocidos por ser menos solubles, menos estables, y con tendencia a la agregación. Además, la purificación de los anticuerpos con bajo pI es difícil y puede ser problemática especialmente durante escalado para uso clínico. Aumentar el pI de los anticuerpos anti-LOX-1, o Fabs, de la invención mejoró su solubilidad, lo que permite que los anticuerpos se puedan formular a concentraciones más altas (> 100 mg / ml). La formulación de los anticuerpos a concentraciones altas (por ejemplo> 100mg/ml) ofrece la ventaja de poder administrar dosis más altas de los anticuerpos a los ojos de los pacientes a través de inyecciones intravítreas, que a su vez pueden permitir reducida frecuencia de dosificación, una ventaja significativa para el tratamiento de enfermedades crónicas, incluyendo trastornos cardiovasculares. PIs más altos también pueden aumentar el reciclaje mediado por FcRn de la versión IgG del anticuerpo permitiendo así al fármaco persistir en el cuerpo durante una duración más larga, requiriendo menos inyecciones. Por último, la estabilidad general de los anticuerpos se mejora significativamente debido al pI más alto resultando en una mayor vida útil y bioactividad *in vivo*. Preferiblemente, el pI es mayor o igual a 8.2.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar usando ensayos estándares disponibles en la técnica y/o divulgados en la presente, tales como los indicados en los ejemplos (por ejemplo, ELISA).

Usos profilácticos y Terapéuticos

Los anticuerpos que se unen a LOX-1 como se describe en la presente, pueden utilizarse a una concentración terapéuticamente útil para el tratamiento de una

enfermedad o trastorno asociado niveles aumentados de LOX-1 y/o actividad al administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de la invención La presente invención proporciona un método de tratamiento de trastornos cardiovasculares asociados con LOX-1, administrando a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de los anticuerpos de la invención. La presente invención proporciona un método de tratamiento de trastornos cardiovasculares asociados con LOX-1, administrando a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de los anticuerpos de la invención.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar, entre otras cosas, para evitar tratar, prevenir, mejorar condiciones o trastornos asociados con LOX-1, incluyendo pero no limitado a trastornos cardiovasculares, disfunción de células endoteliales, trastornos de las células endoteliales, aterosclerosis, arteriosclerosis, hipertensión, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, ldiabetes mellitus, deficiencia de óxido nítrico, infarto de miocardio, estrés oxidativo vascular, isquemia miocárdica, isquemia-reperfusión, sepsis, nefropatía diabética, enfermedad renal, cardiomiopatía, insuficiencia cardiaca, enfermedad arterial periférica, enfermedad cardiaca coronaria, claudicación (por ejemplo, claudicación intermitente, claudicación de Rutherford Clase II / III), enfermedad arterial periférica (PAD), angina (por ejemplo, angina refractaria), enfermedad arterial coronaria (CAD) (por ejemplo, debido a la aterosclerosis de las arterias que alimentan el corazón), accidente cerebrovascular, y vasodilatación anormal dependiente del endotelio.

El tratamiento y / o prevención de trastornos cardiovasculares, por ejemplo, trastornos cardiovasculares asociados a LOX-1, se pueden determinar por un profesional de la salud usando mediciones clínicamente relevantes de la función vascular. Tratamiento de los trastornos cardiovasculares asociados con LOX-1 se refiere a cualquier acción (por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-LOX-1 descrito en el presente documento) que resulta en, o se contempla para dar lugar a, la mejora o preservación de la función vascular, anatomía vascular y/o parámetros hemodinámicos. Además, la prevención en que se refiere a condiciones o trastornos asociados con trastornos cardiovasculares se refiere a cualquier acción (por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-LOX-1 descrito en el presente documento) que previene o retarda un empeoramiento en la función vascular, y/o un parámetro de trastornos cardiovasculares, tal como se define en la presente memoria, en un paciente en riesgo de dicho empeoramiento.

Como los niveles de oxLDLs y LOX-1 solubles se aumentaron tanto en angina estable como en síndromes isquémicos agudos, se espera que los anticuerpos anti-LOX-1 de la invención inhiban el estrés oxidativo vascular, reduzcan la isquemia de miocardio y angina de pecho y mejoren la tolerancia al ejercicio; dichos anticuerpos tienen el potencial para convertirse en el primer tratamiento antianginoso modificador de la enfermedad disponible.

La eficacia de dicha administración terapéutica se puede medir por una evaluación serial de la frecuencia y duración de los eventos isquémicos transitorios (control de ECG ambulatorio) y angina de pecho (cuestionario de angina de pecho de Seattle), y las pruebas de tolerancia al ejercicio en serie con la opción de registro de perfusión. La eficacia también se puede medir mediante el uso de biomarcadores tales como oxLDL de plasma, LOX-1 soluble, y biomarcadores de estrés oxidativo (isoprostanos F2-, malondialdehído, mieloperoxidasa).

"Claudicación", como se usa aquí, incluye claudicación severa y otros términos similares, y describe un impedimento de movilidad y alta necesidad médica no cubierta. La claudicación es una condición caracterizada por una menor isquemia de las extremidades, causando fatiga muscular, dolor por el esfuerzo se alivia con el reposo, movilidad limitada y reducida calidad de vida, y es causada por la aterosclerosis y vasodilatación anormal (por ejemplo, alterada) dependiente del endotelio. Su prevalencia en los EE.UU. es de 8-12 millones de pacientes. Entre pacientes con claudicación intermitente, el 7% se someterá a una cirugía de derivación de extremidades inferiores, 4% requerirá amputaciones mayores, y el 16% desarrollará empeoramiento de claudicación. Los eventos cardiovasculares, como el infarto de miocardio y accidente cerebrovascular, se producen en el 20% de los enfermos de claudicación grave de más de 5 años. El tratamiento actual es quirúrgico y el tratamiento a través de medios menos invasivos, como la administración de los anticuerpos anti-LOX-1 de la invención, representaría un enorme avance terapéutico.

La eficacia de dicha administración terapéutica puede ser medida por una evaluación seriada de claudicación inducida por el ejercicio (flexión plantar y cinta de correr), con puntos finales para incluir tiempo de aparición de dolor, duración de ejercicio y distancia recorrida. La eficacia también se puede medir mediante el uso de biomarcadores mecanicistas tales como oxLDL plasmático y LOX-1 soluble;

biomarcadores de estrés oxidativo (F2-isoprostanos, malondialdehído, mieloperoxidasa); cambios inducidos por el ejercicio en el flujo de extremidades inferiores y saturación muscular de O2.

Otro alta necesidad médica no satisfecha para la cual los anticuerpos anti-LOX-1 de la invención serían terapéuticamente útiles es la angina de pecho refractaria. Angina recurrente en sujetos afectados a pesar del tratamiento médico óptimo (por ejemplo, administración de beta-bloqueadores de de acción prolongada, nitrato y bloqueadores de canales de calcio), sin posibilidad de revascularización. La angina refractaria es una condición caracterizada por dolor en el pecho debido a la isquemia del músculo cardíaco, por lo general debido a la obstrucción o espasmo de las arterias coronarias (por ejemplo, de la enfermedad de las arterias coronarias), con síntomas debilitantes, actividad física muy limitada y la mala calidad de vida. Los 1-1.8 millones de pacientes que sufren de angina de pecho refractaria en EE.UU. experimentan aumento de la mortalidad cardiovascular, a razón de 10% por año; al menos 100.000 nuevos casos de angina refractaria surgen por año.

Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar en combinación con otros agentes para la prevención, tratamiento, o mejora de trastornos asociados con LOX-1 . Por ejemplo, las terapias de estatina se pueden utilizar en combinación con los anticuerpos LOX-1 y los fragmentos de unión a antígeno de la invención para el tratamiento de pacientes con trastornos cardiovasculares.

Composiciones Farmacéuticas

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de unión a LOX-1 (fragmentos intactos o de unión) formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener adicionalmente uno o más de otros agentes terapéuticos que son adecuados para tratar o prevenir, por ejemplo, trastornos cardiovasculares. Los vehículos farmacéuticamente aceptables potencian o estabilizan la composición, o se pueden utilizar para facilitar la preparación de la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos,

agentes retardantes de isotónicos y de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por una variedad de métodos conocidos en la técnica. La vía y / o modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. Se prefiere que la administración sea intravítrea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea, o se administra próxima al sitio del objetivo. El vehículo farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para administración intravítrea, intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

La composición debe ser estéril y fluida. La fluidez adecuada puede mantenerse por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de particula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar de acuerdo con métodos bien conocidos y practicados de forma rutinaria en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; and Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferiblemente bajo condiciones GMP. Típicamente, una dosis terapéuticamente efectiva o dosis eficaz de un anticuerpo de unión a LOX-1 se emplea en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los anticuerpos de unión a LOX-1 se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, varias dosis divididas

pueden ser administradas con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria como se utiliza en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a ser tratados; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas de la presente invención, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica anterior del paciente a tratar, y factores de este tipo.

Un médico o veterinario puede empezar con dosis de los anticuerpos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de trastornos cardiovasculares descritos en este documento variarán dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosificaciones de tratamiento necesitan ser valoradas para optimizar la seguridad y la eficacia. Para la administración sistémica con un anticuerpo, la dosificación oscila de 0,0001 a 100 mg / kg aproximadamente, y más habitualmente de 0,01 a 15 mg / kg, del peso corporal del huésped. Para administración

intravitrea con un anticuerpo, la dosificación puede oscilar de 0.1 mg/ojo a 5mg/ojo. Por ejemplo, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.7 mg/ml, 0.8 mg/ml, 0.9 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.1 mg/ml, 1.2 mg/ml, 1.3 mg/ml, 1.4 mg/ml, 1.5 mg/ml, 1.6 mg/ml, 1.7 mg/ml, 1.8 mg/ml, 1.9 mg/ml, 2.0 mg/ml, 2.1 mg/ml, 2.2 mg/ml, 2.3 mg/ml, 2.4 mg/ml, 2.5 mg/ml, 2.6 mg/ml, 2.7 mg/ml, 2.8 mg/ml, 2.9 mg/ml, 3.0 mg/ml, 3.1 mg/ml, 3.2 mg/ml, 3.3 mg/ml, 3.4 mg/ml, 3.5 mg/ml, 3.6 mg/ml, 3.7 mg/ml, 3.8 mg/ml, 3.9 mg/ml, 4.0 mg/ml, 4.1 mg/ml, 4.2 mg/ml, 4.3 mg/ml, 4.4 mg/ml, 4.5 mg/ml, 4.6 mg/ml, 4.7 mg/ml, 4.8 mg/ml, 4.9 mg/ml, o 5.0 mg/ml. Un régimen de tratamiento de ejemplo implica la administración sistémica una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Un régimen de tratamiento de ejemplo implica la administración sistémica una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses, o como sea necesario (PRN).

El anticuerpo usualmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser semanal, mensual o anual. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles en sangre del anticuerpo de unión a LOX-1 en el paciente. Además intervalos de dosificación alternativos se pueden determinar por un médico y ser administrados mensualmente o como sea necesario para ser eficaces. En algunos métodos de administración sistémica, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1000 µg / ml y en algunos métodos 25-500 µg / ml. Alternativamente, el anticuerpo pueden ser administrado como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. Dosis y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados muestran la vida media más larga que la de los anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosis relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento para el resto de sus vidas. En las aplicaciones terapéuticas, una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos a veces es necesario hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferiblemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, al paciente se puede administrar un régimen profiláctico.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la invención pero no para limitar su ámbito de aplicación. Otras variantes de la invención serán fácilmente evidentes para un experto normal en la técnica y están contempladas por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Preparación de LOX-1 Soluble Humana Recombinante Purificada para su Uso como Antígeno

Una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular (residuos de aminoácidos 61 a 273) de polipéptido LOX-1 humano con el péptido señal de extremo N de CD33 humano, etiqueta de purificación (EFHR), y la secuencia de biotinilación BirA (GLNDIFEAQKIEWHE) (SEC ID N º 144) se subclonó en el vector de expresión de células de mamífero pRS5a. El plásmido resultante, pRS5a_APP-Avi-humano-sLOX-1 (61-273), se transfectó transitoriamente en células HEK293T utilizando métodos de transfección de polietilenimina (PEI) estándares. Las células fueron propagadas en cultivo en suspensión en medio M11V3 de Novartis (Bioconcept) y la transfección se llevó a cabo en concentración final de células de 1.4 x 10_6 células / ml en 5 litros de medio usando un Wave Bioreactor.

Cinco horas después de la transfección, se añadieron 5 litros de medio libre de suero ExCell VPRO (Sigma). Las células se cultivaron a 37 ° C y CO_2 al 5% durante 10 días. Las células fueron cosechadas mediante centrifugación, seguido de filtración con un filtro estéril de 0.22 micras. El sobrenadante clarificado se pasó sobre 20 ml de una resina de afinidad anti-APP (patentada por Novartis) equilibrada con PBS. La columna se lavó con PBS hasta que se alcanzó la línea de base a una absorbancia de 280 nm. A continuación, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de PBS que contenía Triton X-100 al 1% y tri-n-butilfosfato al 0,3%, seguido por 25 volúmenes de columna de PBS. La proteína SLOX-1 se eluyó luego con citrato de sodio a 50 mM, pH 3.0, y las fracciones se neutralizaron con volumen de 1/10 de Tris s 1 M, pH 9.0. Las fracciones relevantes se combinaron y se dializaron exhaustivamente frente a PBS, luego se tomaron alícuotas y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. El análisis analítico de

tamaño mostró que el material de proteína LOX-1 soluble purificado estaba en un % mayor al 95% en forma de dímero, que es la forma esperada de esta proteína.

Ejemplo 2: Preparación de Células HEK293 Transfectadas de LOX-1 Humanas

Para probar la especificidad de unión y la actividad funcional de anticuerpos específicos anti-LOX1, se generaron células HEK293 que sobreexpresan de forma estable LOX-1 humana. Utilizando métodos de transfección de Lipofectamina 2000 estándares, se transfectaron células HEK293-6E con un plásmido de expresión de mamífero que codifica ADNc de LOX-1 de longitud completa humano y resistencia a higromicina. Los cultivos transfectados fueron evaluados para la expresión en la superficie de LOX-1 mediante citometría de flujo en el día tres después de la transfección y después se sometieron a selección de higromicina (200 □g / ml) para enriquecer en células que expresan de forma estable. Las poblaciones clonales se obtuvieron mediante dos rondas secuenciales de dilución limitante y la expresión se confirmó mediante citometría de flujo. Se seleccionaron exclusivamente clones que mantenian estables la expresión de LOX-1 durante más de cuatro semanas en cultivo y se utilizaron en ensayos de caracterización de anticuerpos posteriores.

Ejemplo 3: Preparación de anticuerpos monoclonales

La proteína de LOX-1 humana recombinante se preparó dentro del laboratorio como se describe en el Ejemplo 1, y se utilizó como inmunógeno para la generación de clones de hibridoma anti-LOX-1. El antígeno LOX-1 en PBS se mezcló con un volumen igual de adyuvante de Freund para potenciar la respuesta inmune en ratones Balb / c. Un adyuvante de Freund completo (Sigma F5881) se utilizó para la primera inyección y un adyuvante de Freund incompleto (Sigma F5506) para las inmunizaciones posteriores.

Inmunizaciones de animales y recolección de muestras se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos de uso de animales estándar aprobados por la IACUC. Brevemente, los ratones Balb / c VAF hembra a la edad de 5-6 semanas (Charles River Laboratories) se inmunizaron con la emulsión de antígeno de proteína de LOX-1 humana

y adyuvante. Los ratones se inmunizaron por vía subcutánea durante 4 veces con aproximadamente 20 µg de proteína en 100 µl de la mezcla de antígeno-adyuvante por animal. Las inyecciones se realizaron cada 2-3 semanas para desarrollar la respuesta inmune en los animales. Tres días antes de la fusión celular para la generación de hibridoma, los ratones fueron intraperitonealmente inyectados una vez más con la misma dosis de antígeno LOX-1 mezclado con adyuvante de Freund incompleto, y se sacrificaron para la recolección de bazo en condiciones quirúrgicas esterilizadas en el día de la fusión celular .

Los bazos de los ratones inmunizados se molieron entre dos láminas de microscopio estériles y congeladas para prepararse para suspensión de células individuales en medio RPMI-1640. Las células del bazo se precipitaron y se lavaron dos veces con medio RPMI-1640. Para que las fusiones de células generaran clones de hibridoma, los esplenocitos se mezclaron y se fusionaron con células de mieloma murino P3X63Ag8.653 (Kearney JF et al., 1979. J. Immunol., 123:1548-1550) usando polietilenglicol-1500 como fusógeno según protocolos de fusión estándar (Zhang C. 2012. Methods Mol. Biol. 901:117-135). Tras las fusiones celulares y centrifugación, las células se suspendieron en medio RPMI-1640 completo (200mL/bazo) que contiene suplemento de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) (Sigma H-0262), y se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning-Costar 3596) en 200µL de suspensión de células por pozo.

Después de la incubación a 37 ° C, CO_2 al 5% durante 3-4 días, 100 µl de sobrenadante de cultivo se retiro de cada pozo de las placas y se sustituyo con un volumen igual de medio RPMI-1640 completo que contiene suplemento de hipoxantina-timidina (HT) (Sigma H-0137). Las placas se siguieron incubando en una atmósfera de CO2 al 5% a 37 ° C hasta que los clones de hibridoma habían crecido colonias suficientemente grandes para permitir tamizado de anticuerpos.

Ejemplo 4: Tamizado, Subclonación y Selección de Hibridoma

En la semana 2 después de la fusión, cuando las células de hibridoma habían crecido hasta convertirse en medio-confluente en los pozos de la placa y el sobrenadante

había cambiado a un color naranja, los sobrenadantes de hibridoma se tomaron muestras de las placas para el tamizado de anticuerpos mediante inmunoensayos, tales como la citometría de flujo de inmunofluorescencia para antígenos basados en células LOX-1 o ELISA para antígeno proteico de LOX-1. Para la detección primaria, los sobrenadantes de hibridoma se ensayaron mediante citometría de flujo utilizando células 293-6E transfectadascon LOX-1 frente a las células no transfectadas. Brevemente, células 293-6E transfectadas con LOX-1 humano, o las células no transfectadas, se incubaron respectivamente con 50 µl de sobrenadante de hibridoma, seguido de marcaje con conjugado de fragmento de fluoresceína-AffiniPure Fab con IgG de cabra anti-ratón (H + L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories), y se analizaron mediante citometría de flujo con FACSCalibur de Becton Dickinson en un modo automático.

Mediante análisis de citometría de flujo, se identificaron clones de hibridoma que reaccionaron con células 293-6E transfectadas con LOX-1 pero no con células no transfectadas y se seleccionaron a partir de placas de fusión. Los clones de hibridoma deseados se expandieron en placas T12 para su posterior caracterización. El clon de hibridoma de interés se subclonó mediante dilución limitante y la recolección microscópicamente de colonias individuales para alcanzar una población monoclonal que produce un anticuerpo monoclonal específico a LOX-1. Los subclones de hibridoma seleccionados se expandieron en placas T12 y se congelaron para la criopreservación o se utilizaron para la producción de anticuerpos monoclonales. Los isotipos de anticuerpos monoclonales específicos derivados de clones de hibridoma se determinaron mediante el uso de reactivos de isotipo disponibles comercialmente.

En base a los resultados del cribado, se identificó un panel de 24 clones de hibridoma específicos a LOX-1 humano y se seleccionaron a partir de la inmunización de ratones con antígeno de LOX-1 humano. Uno de estos clones de hibridoma, Clon 39.1E2E10 (abreviado como E2E10, y en este documento se refiere como E2E10 o murino parental), produjo un anticuerpo monoclonal de IgG1 con una cadena ligera kappa, y fue seleccionado como uno de los candidatos principales para la secuenciación de anticuerpos y humanización en base a sus propiedades aglutinantes de LOX-1.

Ejemplo 5: Detección de Anticuerpos Monoclonales para la Inhibición de la Unión de OxLDL a LOX-1

Los anticuerpos LOX-1 se purificaron a partir de sobrenadantes de hibridoma utilizando métodos estándar (por ejemplo, cromatografía de afinidad de la proteína A).

La proteína LOX-1 (61-273) humana soluble en APP-Avi purificada preparada como se describe en el Ejemplo 1 se biotiniló como sigue: proteína LOX-1 soluble purificada (8-10 mg) en 50 mM de buffer de Bicina pH 8,3 en una concentración de aproximadamente 1 mg / ml se incubó en presencia de ATP 10 mM, 10 mM de acetato de magnesio, biotina 0,1 mM, y BirA biotina ligasa (Avidity) a 30 ° C durante 1 hora y luego se coloca a 4 º C durante la noche. La proteína se purificó usando una columna S200 Superdex 16/60 equilibrada con PBS. Las fracciones relevantes se combinaron y la proteína se concentró hasta aproximadamente una concentració de1 mg / ml, se tomaron alícuotas, y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. El porcentaje de biotinilación se evaluó mediante espectrometría de masas mapeo de péptidos de las muestras no biotiniladas y biotiniladas. Típicamente, el rendimiento de biotinilación fue >95%, y no se detectó material no biotinilado. El análisis analítico de tamaño mostró que el material biotinilado estaba en un % del 100% en forma de dímero, que es la forma esperada de esta proteína.

A continuación, la proteína de LOX-1 soluble biotinilada se diluyó a la concentración de 2,5 □g / ml en PBS, y 0,1 ml de esta solución se añadió a pozos de una placa de 96 pozos de NeutrAvidin (número de catálogo Pierce 15128), y a continuación, la placa se incubó durante la noche a 4 ° C. La placa se lavó tres veces con PBS, y luego se bloqueo mediante la adición de 0,3 ml por pozo de Block Ace al 25% (número de catálogo ABD Serotec BUF029) y la incubación de la placa a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación suave. La placa se lavó una vez con PBS. Se prepararon diluciones en serie de anticuerpos LOX-1 diluidos en BSA / PBS al 1%, y 0.1 ml de anticuerpos diluidos se añadieron a la placa. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, después se lavó tres veces con PBS. A continuación, 0.1 ml de oxLDL (OxLDL de unión alta, Kalen Biomédica número de catálogo 770212-7) diluido en BSA / PBS al 1% a una concentración final de 2 ug / ml.

Para generar una curva estándar LDLox, varias concentraciones de oxLDL se pusieron a prueba en ausencia del anticuerpo LOX-1, utilizando una concentración superior de 20 ug / ml oxLDL. Luego, la placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, y después la placa se lavó tres veces con PBS. A continuación, se agregó 0.1 ml / pozo de anticuerpo anti-ApoB100 conjugado con HRP (The Binding Site, Inc., número de catálogo PP086) diluido a 1:1000 en BSA / PBS al 1%, y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. La placa se lavó 6 veces con PBS. A continuación se añadió 0,1 ml/pozo de sustrato de TMB y la placa se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La solución de parada (ácido sulfúrico 2N, 50 □L / pozo) se añadió a cada pozo, y la absorbancia óptica a 450 nm se midio usando un lector de placas adecuado.

Ejemplo 6: Humanización de Anticuerpos Monoclonales

Anticuerpo monoclonal de ratón E2E10 fue Humaneered™ para llevar su secuencia de proteína más cerca a una secuencia de la línea germinal humana y disminuir su inmunogenicidad. Tecnología Humaneering ™ está disponible a través de KaloBios de San Francisco del Sur. Anticuerpos Humaneering ™ genera anticuerpos humanos diseñados con las secuencias de la región V que tienen una alta homología con una secuencia de línea germinal humana al tiempo que conserva la especificidad y la afinidad de los anticuerpo precursores o de referencia (Publicación de Patente de EE.UU. 2005/0255552 y 2006/0134098). El proceso identifica primero los determinantes de especificidad de unión (BSD) a antígeno mínimos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de una referencia Fab (típicamente secuencias dentro de la CDR3 de cadena pesada y la CDR3 de cadena ligera). Mientras se mantienen estas BSDs de cadena pesada y ligera en todas las bibliotecas construidos durante el proceso de Humaneering™, cada biblioteca es centrada en epítopo, y los anticuerpos completamente Humaneered™ finales retienen la especificidad de epítopo del anticuerpo de ratón original.

A continuación, se generan bibliotecas de casetes (en el que una porción de la región variable de cadena pesada o ligera del Fab de ratón se reemplaza con una biblioteca de secuencias humanas). Un sistema de secreción bacteriano se utiliza para

expresar los miembros de la biblioteca en forma de fragmentos de anticuerpos Fab, y la librería se examina para encontrar los Fabs que se unen al antígeno usando un ensayo de unión sencilla de colonia (CLBA) Los clones positivos se caracterizaron adicionalmente para identificar los que tienen la afinidad más alta. Los casetes humanos identificados que soportan la unión en el contexto de secuencias murinas residuales se combinan entonces en una librería de exposición final para generar regiones V completamente humanas.

Los Fabs Humaneered™ resultantes tienen secuencias en segmento V derivadas de bibliotecas humanas, retienen las secuencias BSD cortas identificadas dentro de las regiones CDR3, y tienen 4 regiones marco de línea germinal humana. Estos Fab se convierten a IgG completo mediante clonación de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera en vectores de expresión de IgG. Anticuerpos completamente Humaneered™ generados en este proceso conservan la especificidad de unión del anticuerpo murino precursor, típicamente tienen afinidad equivalente o superior para el antígeno que el anticuerpo precursor, y tienen regiones V con un alto grado de identidad de secuencia en comparación con genes de anticuerpo de la línea germinal humana a nivel de proteínas.

Composiciones de cadena pesada y ligera de anticuerpos LOX-1 Humaneered™ de FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6, y su porcentaje de similitud a la secuencia de la línea germinal humana más cercana se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Composiciones de Cadena Pesada y Ligera de Anticuerpos LOX-1 y el Porcentaje de Similitud más Cercana a la Secuencia de la Línea Germinal Humana (HC = cadena pesada, LC = cadena ligera)

Fab	HC	HC % Vh1-O2	LC	LC % Vk1-L5
FF1	28+ Probados	90	28Lc	94

FF3	28+ Todos	92	28Lc	94
FF4	28+ Todos	92	21Lc	93
FF5	28+ Todos	92	62lc	90
FF6	28+ Todos	92	62lc	90

Ejemplo 7: Inhibición del Anticuerpo LOX-1 de la Unión de OxLDL a la Proteína LOX-1

La capacidad de anticuerpos LOX-1 para inhibir la unión de oxLDL a la proteína LOX-1 se determinó utilizando el método descrito en el Ejemplo 4. Además de "alta unión a OxLDL" de Kalen Biomédica (número de catálogo 770212-7), que se genera mediante la oxidación de las LDL mediada por sulfato de cobre, otras dos formas de LDL modificado se probaron en este ensayo: LDL modificado de malondialdehido (Academia Bio-Medical Co. número de catálogo 20P-MD-L105) y el LDL modificado de hipoclorito. El hipoclorito de LDL modificado se preparó de acuerdo con el siguiente procedimiento. LDL humana (número de catálogo de Kalen Biomedical 770200-4) se diluyó con PBS hasta una concentración final de 0,25 mg / ml. Después se añadió el hipoclorito de sodio (NaOCl, número de catálogo JT Baker 9416-01) a concentración final de 0.1 mM. La solución se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas, después se inactivó mediante la adición de L-metionina a una concentración final de la reacción mediante la adición de 5 µl de de Mehionina a 100 mM por 200 µl de volumen total. Los datos representativos que muestran la inhibición de la unión de LDL modificado a LOX-1 mediante anticuerpos de LOX-1 se muestran en las Figuras 1A-1C, y se describen en la Tabla 3.

TABLA 3 Inhibición del Anticuerpo LOX-1 de la Unión de OxLDL a la Proteína LOX-1

(tabla con valores IC50)

	LLG783 (FF1)	LLG785 (FF3)	LLG786 (FF4)	LLG787 (FF5)	LLG788 (FF6)	E2E10 (murino precursor)
Inhibición de unión de huLOX-1 a LDL oxidado por sulfato de cobre (IC_{50}, nM)	7	8	8	10	12	6
Inhibición de unión de huLOX-1 a LDL modificada por malon-dialdehído (IC_{50}, nM)	15	14	14	17	18	13
Inhibición de unión de huLOX-1 a LDL modificada por hipoclorito (IC_{50}, nM)	4	3	4	5	5	3
unión de diI-OxLDL a LOX-1 en células (IC50, nM)	5,5	3,3	5,0	4,1	5,9	4,0
Unión de anticuerpos LOX-1 biotinilados a Neutrófilos Humanos	0,15	0,13	0,23	0,08	0,28	0,04

(EC_{50}, □g/mL)						

Ejemplo 8: Inhibición del Anticuerpo LOX-1 de la Unión de OxLDL a las células LOX-1/HK293

Las células huLOX-1/HEK293 se mantuvieron en DMEM que contenía FBS al 10% y penicilina-estreptomicina al 1% como una monocapa adherente en matraces T que contienen 20 ml de medio de cultivo por 75 cm^2 de área de superficie. Las células se incubaron en un incubador humidificado en CO_2 al 5% y 37 º C, y se sub-cultivaron cada 2-3 días. Para el paso de las células, se retira el medio de cultivo, y la monocapa se lava una vez con 10-20 de PBS pre-calentado. Después del lavado, se añade 1 ml de TrypLE Express pre-calentado, y las células se incubaron a 37 º C durante 5 min. A continuación, se añadió medio de cultivo fresco precalentado.

Las células huLOX-1/HEK293 se resuspendieron a $1x10^6$ células / ml y se sembraron 50 □L por pozo en una placa de fondo en V de 96 pozos (5 $x10_4$ células por pozo). Los anticuerpos LOX-1 o de control irrelevantes en medio de ensayo (DMEM + 10% FBS) se añadieron luego a las células. Las concentraciones de anticuerpos finales típicas oscilaron entre 0.006 □g/ml y 20 □g/ml. Las células se incubaron a 37 °C durante 1 hora, después se lavaron dos veces con HBSS caliente. Se añadió Dil-oxLDL (LDL "Altamente Oxidado" marcado con Dil humano, Kalen Biomedical, número de catálogo 770262-9; Dil es perclorato de 1,1 '-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina) en 50 ul de medio de ensayo e agregó después a una concentración final de 30 a 100 □g/mL. Las células se incubaron luego a 37 °C durante 2 horas, y después se lavaron dos veces con buffer BACS (FBS al 2% en PBS). Luego las células se analizaron para intensidad de fluorescencia de Di-I mediante citometría de flujo, tal como se representa en la Figura 2 y la Tabla 3.

Ejemplo 9: Ensayo de Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) Inducidas por OxLDL

Anticuerpos de LOX-1 o anticuerpos de control irrelevantes se incubaron a una concentración final de 2x, ya sea solo o en presencia de un $(Fab)_2$ de entrecruzamiento (Fc $(Fab)_2$ de IgG de cabra anti-humano policlonal, número de catálogo Abcam ab98526)) en 0,05 ml de medio de ensayo (DMEM + 10% de FBS) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. La proporción de $(Fab)_2$ de entrecruzamiento a anticuerpo de LOX-1 se varió e incluía proporciones de 1:1 y 1:2. En los experimentos de respuesta a la dosis con LOX-1 o anticuerpo de control solo (sin agente de entrecruzamiento), se utilizaron concentraciones de anticuerpos que van desde 0,005 □g/ml a 20 □g/ml. En experimentos que comparaban anticuerpo solo a anticuerpo con agente de entrecruzamiento, se utilizaron concentraciones de anticuerpos que van desde 0,03 □g/ml a 20 □g/ml.

Las células que expresan LOX-1 humano (huLOX1/HEK293) se disociaron usando TrypLE Express (número de catálogo de Invitrogen 12605-010) y se lavaron una vez con PBS. Las células se resuspendieron a 2 x 10^6 células / ml en medio de ensayo (DMEM + 10% de FBS) y se sembraron a 50 µl / pozo (1 x 10^5 células / pozo) en una placa con fondo en V de 96 pozos (número de catálogo de Costar 3894). Se agregó 50 µl/pozo de solución de anticuerpo de LOX-1 (o de control) con o sin Fab entrecurzante (preparado como se ha descrito anteriormente) y la mezcla se incubó durante 15 min a 37 ° C. Se agregó oxLDL (0.1 ml/pozo en buffer de ensayo, "oxLDL alto" de Kalen, número de catálogo 770252-7) a una concentración final de 25 µg/ml, y la mezcla resultante se incubó durante 100 min a 37 ° C. H2DCFDA se diluyó en medio de ensayo y 0.1ml/pozo se agregó a una concentración final de 5-10 □M, y la mezcla se incubó durante 15 min a 37 ° C. Las células se lavaron una vez con 200 µl / pozo de HBSS que contiene calcio y magnesio, una vez con 200 µl/pozo de búfer de FACS frío (FBS al 2% en PBS), y las células se resuspendieron en 50-100 µl/ pozo de búfer de FACS frío. La fluorescencia generada como resultado de la oxidación de H2DCFDA se midió usando un citómetro de flujo (excitación: 488 nm, emisión: 500/530 nm). Los resultados ejemplares se muestran en las Figuras 3 y 4, y en la Tabla 4.

Tabla 4

Anticuerpos LOX-1 inhiben la producción de especies reactivas de oxígeno inducida por oxLDL (ROS) en células HEK293 transfectadas con LOX-1 humano (tabla con valores

de IC50), sin evidencia de actividad agonista de LOX-1 (anticuerpo solo o anticuerpo + Fab_2 entrecruzante).

	FF1	FF3	FF4	FF5	FF6	E2E10 (murino precursor)
Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células huLOX-1/HEK293 (IC_{50}, nM)	6,0	7,4	5,3	4,8	7,9	5,7
Agonismo de LOX-1?	No	No	No	No	No	No
Agonismo de LOX-1 (anticuerpo + Fab2 anti-humano en proporción molar 1:2 de Fab2 a anticuerpo)	No	No	No	No	No	No
Agonismo de LOX-1 (anticuerpo + Fab2 anti-humano en proporción molar 1:1 de Fab2 a anticuerpo)	No	No	No	No	No	No

Como se ve en las Figuras 4A-4F, los anticuerpos LOX-1 inhiben las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por oxLDL en la producción células HEK293 transfectadas con LOX-1 humano. En la ausencia de oxLDL, anticuerpos LOX-1 (anticuerpos solos o en la presencia de un Fab^2 de entrecruzamiento) no inducen la producción de ROS. Un anticuerpo de control de isotipo no tiene ningún efecto sobre la producción de ROS inducida por oxLDL en células HEK293 transfectadas con LOX-1 humano.

Ejemplo 10: Anticuerpos LOX-1 se Unen a Neutrófilos Humanos Primarios de LOX-1 Nativo

Los anticuerpos LOX-1 fueron biotiniliados utilizando un kit de Thermo Scientific (Kit de Biotinilación de EZ-Link Micro NHS-PEO4; número de catálogo de Thermo Scientific 21955). Los anticuerpos en búfer de PBS a la concentración de 0,5-1,0 mg / ml se incubaron con un exceso molar de 50 veces de reactivo NHS-biotina a temperatura ambiente durante 60 min. El anticuerpo biotinilado se separó del reactivo de biotinilación en exceso usando una ccolumna de giro desalinizador equilibrada en PBS y se utiliza de acuerdo con las instrucciones del fabricante (columna de giro desalinizador Zeba 7KMWCO, número de catálogo de Thermo Scientific 89882). La concentración del anticuerpo biotinilado se determinó con base en la medición de la absorbancia a 280 nm.

Los neutrófilos se aislaron a partir de muestras de sangre obtenidas de donantes sanos utilizando métodos estándar. Brevemente, la sangre entera humana se recogió en un vial que contiene EDTA. A 10 ml de la muestra de sangre, se agregó 10 ml de Búfer de Sedimentación (dextrano al 3%, cloruro de sodio al 0.9%), y la solución resultante se mezcló suavemente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. La capa superior que comprende plasma rico en leucocitos se centrifugó a 1200 rpm (250-500 x g) durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, y el pellet celular se resuspendió inmediatamente en 10 ml de cloruro de sodio al 0.9% a temperatura ambiente. La suspensión de células resultantes se transfirió cuidadosamente a un tubo cónico de 50 ml que contiene 10 ml de Ficoll-Paque, colocando en capas la suspensión de células en la parte superior de la Ficoll-Paque, y después el tubo se centrifugó a 1.400 rpm (400 x g) durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Luego, la capa superior se descarto. Al pellet celular resultante, se agregó 10 ml de cloruro de sodio al 0,2% enfriado con hielo, y la mezcla se incubó durante exactamente 30 segundos para lisar los eritrocitos; 10 ml de 1,6% de cloruro de sodio enfriada con hielo se añadió a restablecer la isotonicidad. La suspensión celular se centrifugó luego a 1200 rpm (250-500 rpm) durante 5 minutos. A continuación, el sobrenadante se descartó, y el procedimiento de lisis de eritrocitos se repitió una vez más. El pellet celular resultante se resuspendió en búfer de FACS (EDTA 2 mM, BSA al 1%, y azida de sodio al 0,2% en PBS) a una densidad celular de 2 x 10^6 células/ml.

La suspensión de células que contiene neutrófilos humanos recién aislados se transfirió (50ul/pozo) a los pozos de una placa de fondo en V de 96 pozos (1 x 10^5 células/pozo) (Costar, número de catálogo 3894). . Se agregó búfer de bloqueo (suero de conejo normal al 4% diluido en búfer de FACS (EDTA a 2 mM, BSA al 1%, y azida de sodio al 0,2% en PBS) (50 ul / pozo) y la placa se incubó en hielo durante 30 minutos. El anticuerpo de LOX -1 biotinilado (10 ul) en búfer de FACS se agregó después a los pozos a concentraciones finales que varían de 1 ng/ml a 5 ug/ml, y la placa se incubó en hielo durante 30 minutos. Luego la placa se centrifugó a 1200 rpm (250-300 x g) durante 3 minutos y el sobrenadante se descartó Luego, las células se lavaron dos veces con 0.2 ml de búfer FACS, y después se agregó 0.1 ml de PE-straptavidin (BD Pharmingen, número de catálogo 554061) diluido a 1:250 en búfer de FACS , y la placa se incubó en hielo durante 30 minutos. Luego, la placa se centrifugó de nuevo, el sobrenadante desechado, y las células se lavaron dos veces con 0.2 ml de búfer de FACS. Las células se resuspendieron en 0.1 ml de búfer de fijación (búfer FACS con paraformaldehído al 2%) y se analizaron usando un instrumento de FACS. Para determinar un valor de EC50 para la unión de neutrófilos mediante anticuerpos LOX-1, la intensidad de la tinción de LOX-1 determinada mediante FACS se representó gráficamente frente a la concentración del anticuerpo como se muestra en la Figura 5 y en la Tabla 3.

Ejemplo 11: Mapeo de Epítopos mediante Espectrometría de Masas de Intercambio de Hidrógeno / Deuterio

Intercambio de hidrógeno-deuterio (HDx) en combinación con espectrometría de masas (MS) (Woods, 2001) se utilizó para mapear el sitio de unión del anticuerpo E2E10 en LOX-1. En HDx, los hidrógenos de amida intercambiables de proteínas son sustituidos por deuterio. Este proceso es sensible a la estructura/dinámica de la proteína y accesibilidad de disolvente y, por lo tanto, es capaz de informar sobre la unión del ligando. La naturaleza no invasiva de HDxMS, alta sensibilidad, capacidad de trabajar con grandes proteínas, y la alta resolución con la que los sitios de unión se pueden mapear lo diferencian de otros métodos. El objetivo de estos experimentos fue la identificación del epítopo de E2E10 en LOX1.

Experimentos de HDx/MS automatizado se realizaron utilizando métodos similares a los descritos en la literatura (Chalmers, 2006). Un manipulador de líquidos Pal HTS de LEAP Tecnologías (Tecnologías de LEAP, Carrboro, NC) se utilizó para todas las operaciones de manipulación de líquidos. El manipulador de líquido fue controlado mediante secuencias de automatización escritos en LEAP Shell y se encuentra en un entorno refrigerado mantenido a 2 º C. Una válvula de inyección de 6 puertos y una estación de lavado fueron montadas en el equipo manipulador de líquidos y facilitaron la inyección de la muestra en el sistema cromatográfico y el lavado de la jeringa. Para la digestión en línea, una columna de enzima (pepsina inmovilizada de Poroszym , 20 x 2.1 x 30 mm, ABI, Foster City, CA) se colocó en la línea entre la válvula de inyección y un cartucho de retención. El sistema cromatográfico, que consta de dos válvulas adicionales (15kPSI Valco, Houston, TX), un cartucho de retención de fase inversa EXP halo C18 de 4µL (Optimize Technologies Inc., Oregon City, OR), y una columna de analítica (ID 300µm, Halo 2.7 micras C18, Michrom Biorecursos Inc.), se encuentra en un recinto refrigerado por separado que se monta delante de la fuente del espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific, San Jose, CA). La temperatura de la caja de alojamiento del sistema cromatográfico se mantuvo a 0 º C mediante enfriadores de Peltier.

Para los controles no deuterados y deuterados, 10 µl de solución de LOX-1 soluble humana (0.73mg/mL) se diluyó con 15 µl de búfer de trietanolamina a 50 mM (pH 7.8). Los complejos se prepararon mediante la mezcla de 10 µl de solución LOX-1 (0.73mg/mL) con una cantidad equimolar de E2E10 y la cantidad apropiada de búfer de trietanolamina a 50 mM (pH 7,8) para llevar el volumen total a 25 µl. Después de la formación de complejos, las soluciones se dejaron incubar durante 30 min. Para iniciar la reacción de intercambio, 75 µl de búfer de D^2O (D_2O en NaCl a 150 mM, Cambridge Isotopes Laboratories) y se dejó a cambio de 10 min. El pH de la mezcla se redujo con la adición de 0.25 ml de buffer de reducción (urea a 8 M, tiourea a 2 M, TCEP a 0,25 M, pH 2,5) para reducir los enlaces disulfuro y ralentizar la tasa de cambio, congelando efectivamente el estado de intercambio de la muestra. Después de 10 min. de reducción, la mezcla se diluyó con 0.5 ml de búfer de enfriamiento rápido (glicina a 50 mM, pH 2.5). A continuación, 0.5 ml de la muestra se inyectaron a través de una columna de digestión en línea en una trampa, y se analizó por LC-MS como se describe a continuación.

El sistema de cromatografía utiliza dos bombas de HPLC separadas para llevar a cabo la digestión en línea, atrapa los péptidos digeridos en una columna de trampa C18, y eluye péptidos atrapados a través de una columna analítica en el espectrómetro de masas. La bomba de "carga" (bomba Surveyor MS, Thermo Scientific, San Jose, CA), que funciona a una tasa de flujo de 125 µl/min (TFA al 0,05%), transfiere muestras del bucle de muestras de válvula de inyección de PAL (500 µl), a través de columna de pepsina el, y en el cartucho de trampa de fase inversa. Después de un paso de carga de 6 min., una válvula de "carga" se cambió para permitir que búfer (ácido fórmico al 0,25%) de la bomba "gradiente" (Nano Acquity, Waters Corp., Milford, MA) fluyera a través de la trampa a un caudal de 20 µl/min durante un periodo de desalinización de 3 min. Después de la etapa de desalinización, una válvula de "desalinización" se cambió para facilitar la elución de péptidos a partir de la trampa y en sobre la columna analítica y en la fuente de iones del espectrómetro de masas. La bomba gradiente entregada a un gradiente de 0 a 40% de B durante 20 min. seguido de 40% a 75% de B durante 5 min. El tiempo total para el gradiente fue de 30 min. Las composiciones de búfer de bomba gradiente fueron A: 99.75:0.25 %v/v (H_2O: ácido fórmico) y B: 99.75:0.25 %v/v (acetonitrilo: ácido fórmico).

Los péptidos proteolíticos se secuenciaron mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). El mismo método se utilizó para la adquisición de LOX-1 no deuterado, LOX-1 deuterado, y todas las muestras de complejo deuteradas a pesar de que sólo los datos de MS2 de la corrida de LOX1 no deuterado se utilizaron para la identificación de péptidos. Para estas adquisiciones, MS/MS fueron adquiridas en el LTQ y barridos MS fueron adquiridos en el Orbitrap. Adquisiciones en el Orbitrap fueron adquiridas con una resolución de 60.000 en todo el rango m/z de 400-2000. Los parámetros de los instrumentos utilizados para todos los experimentos incluyen un voltaje de pulverización de 3.5kV, un tiempo de inyección máximo de 1.000 ms, objetivo LTQ AGC para MS de 50.000 iones y un objetivo FTMS AGC para MS de 1.000.000 iones. Para iniciar el procesamiento de datos, archivos .RAW Orbitrap se convirtieron en archivos. MzXML (Pedrioli 2004) utilizando un programa interno (RawXtract). Posteriormente, los archivos .mzXML se convirtieron en archivos .mzBIN y adquisiciones MS en tándem se busqcaron utilizando SEQUEST (ThermoElectron). Los resultados SEQUEST fueron filtradas utilizando DTASelect (Tabb 2002). Usando las identificaciones de secuencias peptídicas, se utilizó un programa escrito en el laboratorio (Deutoronomy) para extraer automáticamente cromatogramas para cada ión de secuencia

identificada y generar espectros promedio en un rango de m/z especificado y ventana de tiempo de retención. El promedio de espectros fueron suavizados y centrados para determinar la incorporación media de deuterio. Después del procesaminto de automatizado inicial, la calidad y centroiding de cada espectro promedio se validó o corrigió mediante un visor de datos interactivo integrado en Deutoronomy manualmente.

El experimento de mapeo de HDxMS identificó tres regiones de LOX1 que fueron protegidas de manera significativa. Mayor protección se observó para el péptido F_{228}RVRGAVSQTYPSGTCAYI$_{246}$ (SEQ ID NO:3). También se observó protección menor de los péptidos N_{100}ELKEMIETL$_{109}$ y S_{207}RRNPSYPWLWE$_{218}$ (SEC ID NO: 4 y 5, respectivamente). Las regiones protegidas fueron mapeadas en la estructura cristalina de dominio tipo lectina de extremo C (CTLD) de LOX-1 soluble humano obtenida del banco de datos de proteínas (1YPQ). Una de las regiones protegidas, N_{100}ELKEMIETL$_{109}$ (SEC ID NO.: 4), no está presente en la estructura cristalina del CTLD de LOX-1. El péptido F_{228}RVRGAVSQTYPSGTCAYI$_{246}$ (SEQ ID NO: 3) hace mapeo frontal de la molécula de LOX-1 implicado en la unión de ligando por estudios de mutagénesis dirigida por sitio publicados (Ohki et al. (2005) Estructura, 13: 905-917). Por tanto, los resultados indican que E2E10 probablemente actúa como un inhibidor competitivo de la unión del ligando de LOX-1 a LOX-1. Dado que el proceso de humaneering utilizado para convertir E2E10 a las variantes humanizadas FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6 es muy poco probable que cambie la especificidad de epítopo del anticuerpo (véase el Ejemplo 6), estos resultados también identifican el sitio de unión primario de FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6 en LOX-1.

Cambio en la incorporación de deuterio de péptidos derivados de LOX-1 debido a la unión de E2E10 a LOX-1 se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

Epítopo de LOX-1	SEC ID NO:	Cambio en la incorporación de deuterio
EFRHGLNDIF	124	0
EFRHGLNDIFE	125	0

EAQKIEWHESQVSDL	126	0
AQKIEWHESQVSDL	127	0
LTQEQANLTHQKKKLEGQISARQQAEEASQESENELKE	128	0
LTQEQANLTHQKKKLEGQISARQQAEEASQESENELKEMIETL	129	-2
ASQESENELKEMIETL	130	-1
NELKEMIETL	131	-2
FSSGSFNWEKSQEKC	132	0
FSSGSFNWEKSQEKCLSL	133	0
IQQAISY	134	0
SRRNPSYPWLWEDGSPLMPHL	135	-1
WEDGSPLMPHL	136	0
FRVRGAVSQTYPSGTCAYIQRGAVYAENCILAAFSICQKKANLRAQ	137	-9
YIQRGAVYAEN	138	0
IQRGAVYAEN	139	0
AAFSICQKKANL	140	0
AAFSICQKKANLRAQ	141	0

FSICQKKANL	142	0
FSICQKKANLRAQ	143	0

Ejemplo 12: Preparación de LOX-1 Soluble de Mono Cynomolgus Recombinante Purificada Para Uso en Ensayos de Unión de Anticuerpos de LOX-1

Para determinar las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de LOX-1 de mono cynomolgus, los ARNs totales se extrajeron de los órganos obtenidos a partir de 3 monos individuales: 3 órganos de un individuo de Zyagen/GW, y 12 órganos de 2 individuos de Covance, Inc. Los ARNs totales se utilizaron luego para la amplificación por PCR, utilizando los cebadores de la región no traducida que se han diseñado de acuerdo a las bases de datos públicas (Uniprot, NCBI). Métodos de secuenciación estándar se utilizaron para determinar las secuencias de ácidos nucleicos de los ARNm de LOX-1 amplificados. Dentro del dominio extracelular de LOX-1 de mono cynomolgus (correspondiente a los aminoácidos 61 a 273), las secuencias de aminoácidos de LOX-1 de cynomolgus derivadas de los 3 monos individuales eran idénticos.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular (residuos de aminoácidos 61 a 273) de polipéptido LOX-1 de mono cynomolgus con el péptido señal de extremo N de CD33 humano, etiqueta de purificación (EFHR), y la secuencia de biotinilación BirA (GLNDIFEAQKIEWHE) (SEC ID NO 144) se subclonó en el vector de expresión de células de mamífero pRS5a. Expresión y purificación de LOX-1 soluble de mono cynomolgus se llevó a cabo usando los mismos métodos descritos para el LOX-1 soluble humano en el Ejemplo 1. La secuencia de aminoácidos de LOX-1 de mono cynomolgus soluble en APP-Avi maduro (61-273) se muestra en la Tabla 6. Para algunos experimentos, proteina LOX-1 soluble de mono cynomolgus se biotinilizó usando el mismo método descrito para el LOX-1 soluble humano en el Ejemplo 5.

Tabla 6

SEQ ID 6: Secuencia de aminoácidos de LOX-1 de mono cynomolgus soluble en APP-

Avi maduro (61-273) (etiquetas de APP y Avi subrayadas)
EFRHGLNDIFEAQKIEWHESQVSNLLKQQQTNLTHQKNKLEGQISARQQAEEASQ ESQNELKEMIETLAWKLNEKSKEQMELHHQNLNLQETLKRVANCSAPCPQDWI WHEENCYLFSTGSFNWEKSQEKCLSLDAKLLKINSTADLDFIQQAISYSSFPFWM GLSRRNPSYPWLWEDGSPLMPHLFRIR GAVSQTYPSGTCAYIQRGAVYAENCILAAFSICQKKANLRAQ

Ejemplo 12

Determinación Constante de Disociación de Anticuerpo por Ensayo de unión de Biacore

Para la unión el anticuerpo de LOX-1 murino E2E10 a LOX-1 humano y de mono cynomolgus, una Biacore T200 se cebó con búfer de la corrida fresco y filtrado (1x HBS-EP + (número de catálogo de GE BR-1006-60)). Un chip CM5 (número de catálogo de GE BR-1005-30) se preparó usando un kit de captura de anticuerpos de ratón (número de catálogo de GE BR-1008-38) y un kit de acoplamiento de aminas (número de catálogo de GE BR-1000-50). Brevemente, un nuevo chip se activó con EDC/NHS en 10ul/min durante 420 seg. Anticuerpo de IgG anti-ratón fue inmovilizado a 30ug/ml en acetato a 10 mM de pH 5.0 a 10ul/min de 420 seg. La superficie del chip fue desactivada con solución de etanolamina 1M (10ul/min durante 420 seg) y a continuación se acondicionó tres veces con glicina-HCl a 10 mM, pH 1.5 (número de catálogo de GE BR-1003-54) en 60ul/min durante 30 seg.

Una corrida del método fue programada para medir la cinética de la unión de LOX-1 soluble humano o de mono cynomolgus a anticuerpos anti-LOX-1. 5 ciclos de inicio se llevaron a cabo de la siguiente manera: 1) búfer de corrida durante 30 segundos a 60ul/min, 2) búfer de corrida durante 350 seg con 350 seg de disociación a 60ul/min, lavado adicional con búfer de regeneración (Glicina-HCl, pH 1,5, 0,05% P20 (número de catálogo de GE BR-1000-54)), 3) búfer de regeneración durante 60s en 60ul/min, 4) búfer de regeneración durante 35s en 60ul/min, lavado adicional con búfer de corrida que incluye un control de arrastre.

Para ciclos de muestreo, 1) mAb de LOX-1 Ms-anti-Hu fue capturado en un flujo celular 2, 3, o 4 durante una cantidad predeterminada de tiempo que permitió la captura de aproximadamente 20RUs a 10ul/min. La célula de flujo 1 se utilizó como una referencia, 2) búfer de corridad durante 30 s a 60ul/min, 3) LOX-1 soluble humano o LOX-1 soluble de mono cynomolgus diluido en búfer de corrida a diversas concentraciones (con al menos dos muestras duplicadas y múltiple búfers de diferenciación durante 350 segundos a 60ul/min, ya sea con tiempo de disociación de 750 seg o 3.000 seg), 4) búfer de regeneración durante 60 segundos a 60ul/min, 5) búfer de corrida durante 35s a 60ul/min, lavado adicional con búfer de corrida e incluyendo un control de arrastre. Los datos se analizaron utilizando búfers de diferenciación, diferenciación de referencia, y un modelo de unión 1:1 para ajuste de la curva con el fin de determinar la asociación y constantes de velocidad de disociación (ka y kd) y las constantes de unión en equilibrio (KD) (ver los resultados para E2E10 en las Tablas 7 - 8).

Mediciones de resonancia de plasmón de superficie que cuantifican la interacción de los anticuerpos de LOX-1 humanizado con LOX-1 humano o de mono cynomolgus se realizaron con el biosensor óptico BIAcore T200 en un chip CM5. IgG de cabra anti-h (gamma) (Invitrogen H10500) se revistió a 3000 RU en el chip CM5 en búfer de acetato, pH 4,0. El búfer de corrida utilizado fue PBS, pH 7.4 (filtrado, desgasificado). Anticuerpos de ensayo se cargan en células de flujo individuales a una concentración de 1 ug / ml a una velocidad de flujo de 10 uL / min. El número de destino de la captura de IgG fue entre 20-30 RU, en búfer HBS-EP (HEPES 0.01 M, pH 7.4, NaCl a 0.15 M, EDTA a 3 mM, 0.05% P20). Se diluyó LOX-1 soluble humano o de mono cynomolgus a una concentración de 33 nM en búfer de HBS-EP, después se diluyó en serie (1:3) a una concentración de 0.137 nM. Esto representa seis concentraciones diferentes de LOX-1 humano o de mono cynomolgus. El antígeno se introdujo en flujos celulares individuales a una velocidad de flujo de 30 uL / min. Los parámetros para el tiempo de asociación se establecieron a 700 segundos y el tiempo de disociación se fijó en 5.400 segundos. Los datos se analizaron utilizando búfers de diferenciación , diferenciación de referencia, y un modelo de unión 1:1 para ajuste de la curva con el fin de determinar la asociación y constantes de velocidad de disociación (ka y kd) y las constantes de unión en equilibrio (KD) (ver los resultados para FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6 en las Tablas 7 - 8).

Tabla 7

Constantes de disociación (K^D) de Unión de Anticuerpos de LOX-1 que se unen a LOX-1 Humano Soluble determinada por Ensayos Cinéticos de Unión de Biacore

	FF1	FF3	FF4	FF5	FF6	E2E10 (murino precursor)
k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	$1.0x10^6$	$1.0x10^6$	$2.2x10^6$	$1.1x10^6$	$6.8x10^5$	$1.7x10^6$
k_d (s^{-1})	$1.9x10^{-5}$	$2.0x10^{-5}$	$5.2x10^{-6}$	$3.6x10^{-5}$	$2.3x10^{-5}$	$3.2x10^{-5}$
K_D, pM	19	21	2	34	34	18

Tabla 8

Constantes de disociación (K_D) de Unión de Anticuerpos de LOX-1 a LOX-1 Soluble de Mono Cynomolgus Determinada mediante Ensayos Cinéticos de Unión de Biacore

	FF1	FF3	FF4	FF5	FF6	E2E10 (murino precursor)
k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	$1.1x10^6$	$7.7x10^5$	$2.1x10^6$	$1.4x10^6$	$9.5x10^5$	$1.7x10^6$
k_d (s^{-1})	$1.3x10^{-5}$	$1.7x10^{-5}$	$2.6x10^{-6}$	$4.8x10^{-5}$	$5.0x10^{-5}$	$2.5x10^{-5}$
K_D, pM	12	23	1	35	53	15

Ejemplo 13: Determinación Constante de Disociación de Anticuerpo mediante Ensayo de Titulación de Equilibrio de Solución (SET)

El siguiente protocolo SET se utilizó para determinar el valor KD para la unión de E2E10 biotinilado a LOX-1 soluble humana. Una placa MSD de 96 pozos (placa Standard Bind, número de catálogo de MSD L15XA-3) se recubrió con 50 uL LOX-1 soluble humano a 0.25 ug/ml en PBS mediante incubación durante la noche a 4 ° C. Las muestras en fase de solución se prepararon mediante titulación de LOX-1 soluble humana en el diluyente de SET (PBS, BSA al 0,5%, Tween-20 al 0,1%, Triton X-100 al 0,1%) en una placa de 96 pozos de polipropileno de fondo en V. Esta serie de dilución se combinó 1:1 (100 □L totales) con E2E10 biotinilado diluido en diluyente de SET, y las muestras se incubaron durante la noche a temperatura ambiente con agitación.

La placa MSD recubierta se lavó tres veces con búfer de lavado (PBS, Tween-20 al 0,05%) usando un lavador de placas y luego se invirtió y se transfirió en un Kimwipe para eliminar el líquido residual. A continuación, la placa se bloqueó con 200 uL/pozo de búfer de bloqueo de SET (PBS, BSA al 2%, Tween-20 al 0,1%, Triton X-100 al 0,1%) y se incubaron durante 1 h con agitación suave. La placa se lavó una vez. 25 □L/pozo de la muestra de unión en equilibrio en fase de solución se añadió a la placa, por duplicado, y se incubó durante 30 min con agitación. La placa se lavó tres veces. 25 □ L / pozo de Estreptavidina de SULFO-TAG (número de catálogo de MSD R32AD-1) diluido 1:500 en diluyente de SET se añadió a la placa y se incubó durante 1 hora con agitación suave. La placa se lavó tres veces. 100 □ L de Buffer T de Lectura (número de catálogo de MSD R92TC-1) se añadió a la placa y se leyó en un MSD SECTOR Imager 6000. Los valores de KD se determinaron ajustando los datos a la siguiente ecuación:

Y= (Bmax/(CAb/2))((CAb/2)-((((((CAg+CAb)+KD)/2)-((((((CAg+CAb)+KD)^2)/4)-(CAg*CAb))^0.5))^2)/(2*CAb))),*

donde Bmax es la señal cuando no hay proteína LOX-1 presente en solución, CAb es la concentración constante de anticuerpo de LOX-1 en solución, CAg es la concentración de LOX-1 soluble en solución, y KD es la constante de unión de equilibrio.

Para anticuerpos de LOX-1 humanizados FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6, el siguiente protocolo de ensayo de titulación de equilibrio de solución (SET) se utilizó para determinar los valores de K_D. Los ensayos se realizaron en una placa de polipropileno de 96 pozos (Thermo Scientific, no. de catálogo. AB-1127) como sigue. Una concentración constante de anticuerpo de LOX-1 (1 pM) se mezcló con diferentes concentraciones de proteina de LOX-1 no biotinilada humana o de mono cynomolgus (dilución 3 veces en serie que va desde 1 nM a 0.017 pM) en búfer de SET (PBS, pH 7.4 sin $CaCl_2$ o $MgCl_2$, Gibco, no. de catálogo P7949;. albúmina de suero bovino al 0.5% peso/volumen, ácidos grasos libres, Calbiochem, no. de catálogo 26575,. y Tween-20 al 0,02% v / v, Sigma, no. de catálogo P7949). El volumen de reacción final fue de 80 □L. La placa se selló con una película adhesiva (VWR, no. de catálogo. 60941-062) y se incubó a 22 ° C durante 14 horas con agitación constante (300 rpm).

Durante el mismo período, una placa MSD recubierta con estreptavidina de 384 pozos (Meso Scale Discovery, no. de catálogo L21SA) fue bloqueada mediante incubación de la placa con 50 □ l de búfer de bloqueo (PBS, pH 7.4, albumumina de suero bovino al 5% peso/volumen) por pozo durante la noche a 4 ° C. Después la placa MSD bloqueada se lavó 3 veces con búfer de lavado (PBS, pH 7,4 y Tween-20 al 0,05% v / v) usando un lavador de placas (BioTek). Tras el lavado, proteína de LOX-1 soluble humana o de mono cynomolgus biotinilado (25 pM, 15 □L por pozo) se inmovilizó sobre la superficie de incubación a 22 ° C durante una hora con agitación constante (600 rpm). Luego, la placa se lavó 3 veces como se describió anteriomente. En algunos experimentos, proteína de LOX-1 humana soluble no biotinilada se usó (R & D Systems, no. de catálogo 1798-LX-050.); en este caso la proteína LOX-1 se inmovilizó mediante incubación durante la noche a concentración de 1 nM en una placa estándar de MSD (MSD, no. de catálogo L21XA). Las reacciones de unión en equilibrio (15 □L por pozo) se aplicaron luego a la placa MSD con LOX-1 inmovilizado y se incubó durante 30 min. El material no unido se eliminó por lavado de la placa, y el anticuerpo capturado se detectó mediante la adición de 15 □L por pozo de una dilución 1:500 de IgG de cabra anti-humano marcada con Sulfo (Meso Scale Discovery, no. de catálogo R3AJ-1) . La placa se incubó durante una hora con agitación constante (600 rpm). La placa se lavó 3 veces, y luego se agregó 15 □L / pozo de búfer T de lectura MSD 1X (MesoScale Discovery, no. de catálogo R92TC-2) y la placa se desarrolló utilizando un Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery). Los datos se transfirieron a Excel para su análisis y se representaron gráficamente utilizando GraphPad Prism V5. Los valores de K_D se determinaron ajustando los datos a la siguiente ecuación:

Y= (Bmax/(CAb/2))((CAb/2)-((((((CAg+CAb)+KD)/2)-((((((CAg+CAb)+KD)^2)/4)-(CAg*CAb))^0.5))^2)/(2*CAb))),*

donde Bmax es la señal cuando no hay proteína LOX-1 presente en solución, CAb es la concentración constante de anticuerpo de LOX-1 en solución, CAg es la concentración de LOX-1 soluble en solución, y KD es la constante de unión de equilibrio. Resultados para FF1, FF3, FF4, FF5, FF6 y E2E10 se muestran en la Tabla 9 y la Figura 6).

Tabla 9

Determinación de Constantes de Disociación (K_D) de Anticuerpo de LOX-1 Por Ensayos de Titulación de Equilibrio de Solución (SET)

Soluble LOX-1	FF1	FF3	FF4	FF5	FF6	E2E10 (precursor de ratón)
APP-Avi-LOX-1 Soluble Humano (K_D, pM por SET)	1,8	1,6	0,5	0,7	2,3	2
His_9-LOX-1 Soluble Humano De R&D Systems (K_D, pM por SET)	3,1	2,3	0,7	0,8	2,0	ND
APP-Avi-LOX-1 Soluble de Mono Cynomolgus (K_D, pM por SET)	1,8	3,4	0,7	0,6	1,6	ND

Incorporación por referencia Todas las referencias citadas en el presente documento, incluidas las patentes, solicitudes de patente, documentos, libros de texto, y similares, y las referencias citadas en el mismo, se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

Equivalentes La especificación escrita anterior se considera suficiente para permitir a un experto en la técnica poner en práctica la invención. La descripción anterior y los ejemplos detallan ciertas realizaciones preferidas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Se apreciará, sin embargo, que sin importar lo detallado que lo anterior puede aparecer en el texto, la invención puede ponerse en práctica de muchas maneras y la invención debe interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y cualesquiera equivalentes de las mismas.

REIVINDICACIONES:

1. Un anticuerpo anti-LOX-1 aislado o fragmento del mismo.

2. Un anticuerpo anti-LOX-1 aislado o fragmento del mismo que se une al dominio de unión al ligando de LOX-1.

3. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a un epitopo de LOX-1, en donde el epitopo comprende los residuos aminoácidos 100-109, 207-218, o 228-246 de LOX-1.

4. Un anticuerpo aislado o fragmento según cualquier reivindicación anterior, en donde dicho anticuerpo o fragmento bloquea la unión de oxLDL a la proteína LOX-1.

5. Un anticuerpo aislado o fragmento según cualquier reivindicación anterior, en donde dicho anticuerpo o fragmento inhibe la producción inducida por oxLDL de especies reactivas de oxigeno.

6. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a una proteína LOX-1 humano con una Kd inferior o igual a 34 pM, medida por Biacore, o inferior o igual a 4 pM, tal como se mide por el ensayo de valoración con solución de equilibrio (SET).

7. Un anticuerpo aislado o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende al menos una región determinante de complementariedad que tiene una identidad de al menos el 95% con al menos una de las CDRs enumeradas en la Tabla 1.

8. Un anticuerpo aislado o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de la Tabla 1.

9. Un anticuerpo aislado o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una CDR1, CDR2, y CDR3

de la Tabla 1, en la que la variante tiene al menos de uno a cuatro cambios de aminoácidos en una de CDR1, CDR2, o CDR3.

10. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a LOX-1 humano, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 10, 30, 50, 70, y 90.

11. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a LOX-1 humano, en el que el anticuerpo o fragmento comprende un VH seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, o 94; y una VL seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 24, 44, 64, 84, o 104 o una secuencia aminoácida con 97-99% de identidad de la misma.

12. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada variable seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74 o 94.

13. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada variable seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 24, 44, 64, 84 o 104.

14. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada variable seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74 o 94; y la secuencia de cadena ligera variable seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 24, 44, 64, 84 o 104.

15. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 8, 28, 48, 68, y 88, CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, y 89; CDR3 seleccionada del grupo que consta de 10, 30, 50, 70, y 90; CDR1 de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 18, 38, 58, 78, y 98, CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, y 99; y CDR3 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, y 100.

16. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 11, 31, 51, 71, y 91, CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 12, 32, 52, 72, y 92; CDR3 seleccionada del grupo que consta de 13, 33, 53, 73, y 93; una CDR1 de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 21, 41, 61, 81, y 101, CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 22, 42, 62, 82, y 102; y CDR3 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 23, 43, 63, 83, y 103.

17. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 8; CDR2 de la SEC ID NO: 9; CDR3 de la SEC ID NO: 10; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 11; CDR2 de la SEC ID NO: 12; y CDR3 de la SEC ID NO: 13.

18. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 28; CDR2 de la SEC ID NO: 29; CDR3 de la SEC ID NO: 30; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 31; CDR2 de la SEC ID NO: 32; y CDR3 de la SEC ID NO: 33.

19. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 48; CDR2 de la SEC ID NO: 49; CDR3 de la SEC ID NO: 50; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 51; CDR2 de la SEC ID NO: 52; y CDR3 de la SEC ID NO: 53.

20. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 68; CDR2 de la SEC ID NO: 69; CDR3 de la SEC ID NO: 70; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 71; CDR2 de la SEC ID NO: 72; y CDR3 de la SEC ID NO: 73.

21. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 88; CDR2 de la SEC ID NO: 89; CDR3 de la SEC ID NO: 90; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 91; CDR2 de la SEC ID NO: 92; y CDR3 de la SEC ID NO: 93.

22. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

23. Un método de tratamiento de un trastorno relacionado con LOX-1 que comprende administrar a un sujeto afectado con un trastorno LOX-1, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.

24. El método de la reivindicación 23, en el que el sujeto es afectado con una o más entre claudicación intermitente y claudicación de Rutherford Clase II/III.

25. El método de la reivindicación 23, en donde el sujeto es afectado con angina.

26. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une al mismo epítopo que un anticuerpo aislado o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.

27. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a una proteína de LOX-1 humano y compite de manera cruzada con un anticuerpo aislado o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
55493-WO-PCT		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2014/043315	20 June 2014 (20-06-2014)	21 June 2013 (21-06-2013)
Applicant		
NOVARTIS AG		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 8 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:
      ☒ the international application in the language in which it was filed
      ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant
   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

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

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1
      ☒ as suggested by the applicant
      ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/043315

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. (means)

   [ ] on paper

   [X] in electronic form

   b. (time)

   [ ] in the international application as filed

   [ ] together with the international application in electronic form

   [X] subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [X] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/043315

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 all searchable 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.:

1, 2, 10-21(completely); 4, 5, 7-9, 22-27(partially)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/043315

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XU X ET AL: "Anti-LOX-1 rescues endothelial function in coronary arterioles in atherosclerotic ApoE knockout mice", ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY, HIGHWIRE PRESS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 27, no. 4, 1 April 2007 (2007-04-01), pages 871-877, XP002715625, ISSN: 1524-4636, DOI: 10.1161/01.ATV.0000259358.31234.37 [retrieved on 2007-02-01] cited in the application page 872, left-hand column, paragraph 2 page 873, right-hand column, paragraphs 2,4 discussion ----- -/--	1,2,4,5, 7-27

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report
11 November 2014	06/03/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bayer, Annette

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 444 492 A1 (HIROSHIMA BIO MEDICAL CO LTD [JP]) 25 April 2012 (2012-04-25) paragraphs [0004], [0005], [0014] - [0043], [0046] - [0048], [0099]; claims 1-26; examples 1-5	1,2,4,5, 7-27
X	EP 1 418 234 A1 (ABGENIX INC [US]) 12 May 2004 (2004-05-12) paragraphs [0001], [0016] - [0021]; claims 1,2,10,13-30; figures 1,2,4; examples 3-16	1,2,4,5, 7-27
X	EP 2 048 161 A1 (SHIONOGI & CO [JP]) 15 April 2009 (2009-04-15) paragraphs [0001], [0005], [0006], [0813], [0034] - [0038], [0044] - [0047], [0071] - [0075], [0167]; claims 1-15; examples 3,4	1,22,23, 26,27
X	WO 2012/009709 A1 (PAUL SUDHIR [US]; NISHIYAMA YASUHIRO [US]; PLANQUE STEPHANIE [US]; MAS) 19 January 2012 (2012-01-19) claim 20; sequence 20	7-16
A	OHKI I ET AL: "Crystal Structure of Human Lectin-like, Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1 Ligand Binding Domain and Its Ligand Recognition Mode to OxLDL", STRUCTURE, CURRENT BIOLOGY LTD., PHILADELPHIA, PA, US, vol. 13, no. 6, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 905-917, XP004923180, ISSN: 0969-2126, DOI: 10.1016/J.STR.2005.03.016 page 911, right-hand column, paragraph 1 - page 913, right-hand column, paragraph 1; figures 1,4,5	1,2,4,5, 7-21,26, 27
A	MCKAY BROWN ET AL: "Tolerance to single, but not multiple, amino acid replacements in antibody V-H CDR2: A means of minimizing B cell wastage from somatic hypermutation?", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 156, no. 9, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 3285-3291, XP002649029, ISSN: 0022-1767 the whole document	1,2,4,5, 7-21,26, 27

-/--

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WARK K L ET AL: "Latest technologies for the enhancement of antibody affinity", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 58, no. 5-6, 7 August 2006 (2006-08-07), pages 657-670, XP024892147, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2006.01.025 [retrieved on 2006-08-07] the whole document, in particular page 659, left-hand column, third paragraph and table 2 -----	1,2,4,5, 7-21,26, 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2014/043315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2444492 A1	25-04-2012	EP 2444492 A1	25-04-2012
		US 2012087926 A1	12-04-2012
		WO 2010147171 A1	23-12-2010
EP 1418234 A1	12-05-2004	AU 784677 B2	25-05-2006
		AU 3606301 A	12-09-2001
		CA 2401993 A1	07-09-2001
		EP 1418234 A1	12-05-2004
		JP 2013237670 A	28-11-2013
		US 2003143226 A1	31-07-2003
		US 2008241134 A1	02-10-2008
		WO 0164862 A1	07-09-2001
EP 2048161 A1	15-04-2009	AU 2007277684 A1	31-01-2008
		CA 2660947 A1	31-01-2008
		CN 101522715 A	02-09-2009
		CN 102675461 A	19-09-2012
		EP 2048161 A1	15-04-2009
		JP 5147696 B2	20-02-2013
		KR 20090039802 A	22-04-2009
		KR 20110075052 A	05-07-2011
		TW 200819465 A	01-05-2008
		US 2009203039 A1	13-08-2009
		WO 2008013257 A1	31-01-2008
WO 2012009709 A1	19-01-2012	US 2012121633 A1	17-05-2012
		WO 2012009709 A1	19-01-2012

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, 2, 10-21(completely); 4, 5, 7-9, 22-27(partially)

An isolated anti-Lox-1 antibody or fragment thereof and related subject-matter.

1.1. claims: 2(completely); 4, 5, 7-9, 22-27(partially)

An isolated anti-LOX-1 antibody or fragment thereof that binds to the ligand binding domain of LOX-1 and related subject-matter.

1.2. claims: 10-21(completely); 22-27(partially)

The antibodies designated FF1, FF3, FF4, FF5 and FF6 characterized by structural features and related subject-matter

---

2. claims: 3(completely); 4, 5, 7-9, 22-27(partially)

An isolated antibody or fragment thereof that binds to an epitope of LOX-1,
wherein the epitope comprises amino acid residues 100-109, 207-218, or 228-246 of LOX-1.

---

3. claims: 6(completely); 7-9, 22-27(partially)

An isolated antibody or fragment thereof that binds to a human LOX-1 protein with a KD of less than or equal to 34 pM, as measured by Biacore, or less than or equal to 4 pM, as measured by solution equilibrium titration assay (SET).

Docket: PAT055493-WO-PCT

IN THE WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION

International Application No.	:	PCT/US2014/043315
International Filing Date	:	20 June 2014
Earliest Priority Date	:	21 June 2013
Applicant	:	Novartis AG

REQUEST UNDER PCT RULE 92BIS TO RECORD A CHANGE

Sir:

The undersigned respectfully requests that IRM LLC be removed as Applicant for the above-referenced application since the company has merged/transitioned to Novartis AG. Please find attached an updated PCT Request form.

Please also note that the updated PCT Request form also includes Declaration information.

We hereby request that all records be updated with this information and a confirmatory PCT Form 306 be issued.

It is believed that no fee is due in connection with this paper. In the event any fee variance exists, please charge the fee to our Deposit Account No. 11797.

Dated: 17 December 2015

Respectfully submitted,

By _____

Paul J. Paglierani
Authorized Signatory
Novartis AG
Common Representative

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference *(if desired) (12 characters maximum)* 55493-WO-PCT

Box No. I TITLE OF INVENTION

LECTIN-LIKE OXIDIZED LDL RECEPTOR1 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

NOVARTIS AG
Lichtstrasse 35
Basel, Switzerland

Telephone No.

Facsimile No.

Applicant's registration No. with the Office

E-mail authorization: Marking one of the check-boxes below authorizes the receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority to use the e-mail address indicated in this Box to send, notifications issued in respect of this international application to that e-mail address if those offices are willing to do so.

☐ as advance copies followed by paper notifications; or ☒ exclusively in electronic form (no paper notifications will be sent).

E-mail address: pip_inbox.phchbs@novartis.com

State *(that is, country)* of nationality: CH

State *(that is, country)* of residence: CH

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☐ agent ☒ common representative

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

NOVARTIS AG
Lichtstrasse 35
Basel, Switzerland

Telephone No.

Facsimile No.

Agent's registration No. with the Office

E-mail authorization: Marking one of the check-boxes below authorizes the receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority to use the e-mail address indicated in this Box to send, notifications issued in respect of this international application to that e-mail address if those offices are willing to do so.

☐ as advance copies followed by paper notifications; or ☒ exclusively in electronic form (no paper notifications will be sent).

E-mail address: pip_inbox.phchbs@novartis.com

☐ **Address for correspondence:** Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

HELDWEIN, Kurt Alex
100 Technology Square
Cambridge, Massachusetts 02139
United States of America

This person is:
- [ ] applicant only
- [X] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: PL

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of:
- [ ] all designated States
- [X] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

SPLAWSKI, Igor
100 Technology Square
Cambridge, Massachusetts 02139
United States of America

This person is:
- [ ] applicant only
- [X] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: PL

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of:
- [ ] all designated States
- [X] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

BROGDON, Jennifer
250 Massachusetts Avenue
Cambridge, Massachusetts 02139
United States of America

This person is:
- [ ] applicant only
- [X] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of:
- [ ] all designated States
- [X] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

GOLDSTEIN, Joshua
10675 John Jay Hopkins Drive
San Diego, California 92121
United States of America

This person is:
- [ ] applicant only
- [X] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of:
- [ ] all designated States
- [X] the States indicated in the Supplemental Box

[X] Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

DOLE, William
220 Massachusetts Avenue
Cambridge, Massachusetts 02139
United States of America

This person is:
[ ] applicant only
[X] applicant and inventor
[ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [X] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

TRAUGER, John
100 Technology Square
Cambridge, Massachusetts 02139
United States of America

This person is:
[ ] applicant only
[X] applicant and inventor
[ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [X] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

ZHANG, Chonghui
300 Technology Square
Cambridge, Massachusetts 02139
United States of America

This person is:
[ ] applicant only
[X] applicant and inventor
[ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: CN

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [X] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
[ ] applicant only
[ ] applicant and inventor
[ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [ ] the States indicated in the Supplemental Box

[ ] Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. *If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, **the space is insufficient** to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No.... " (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:*

   *(i) **if more than one person is to be indicated as applicant and/or inventor** and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;*

   *(ii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication **"the States indicated in the Supplemental Box"** is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;*

   *(iii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, **the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States**: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;*

   *(iv) if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are **further agents**: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box IV;*

   *(v) if, in Box No. VI, there are **more than three earlier applications whose priority is claimed**: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.*

2. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition: in such a case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication **"patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition"** or **" utility certificate of addition,"** the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other patent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(i) and 49bis.1(a) or (b)).*

3. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such a case, write "United States of America" or "US" and the indication **"continuation"** or **"continuation-in-part"** and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(ii) and 49bis.1(d)).*

Continuation of Box No. II:

Novartis AG is the Applicant for all designated states except for the US

Continuation of Box No. III:

HELDWEIN, Kurt Alex is an Applicant for the US only

SPLAWSKI, Igor is an Applicant for the US only

BROGDON, Jennifer is an Applicant for the US only

GOLDSTEIN, Joshua is an Applicant for the US only

DOLE, William is an Applicant for the US only

TRAUGER, John is an Applicant for the US only

ZHANG, Chonghui is an Applicant for the US only

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request **constitutes under Rule 4.9(a), the designation** of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.
However,

☐ DE Germany **is not designated** for any kind of national protection.

☐ JP Japan **is not designated** for any kind of national protection.

☐ KR Republic of Korea **is not designated** for any kind of national protection.

(The check-boxes above may only be used to exclude (irrevocably) the designations concerned if, at the time of filing or subsequently under Rule 26bis.1, the international application contains in Box No. VI a priority claim to an earlier national application filed in the particular State concerned, in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of this earlier national application.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM AND DOCUMENTS

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application *(day/month/year)*	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 21 June 2013 (21.06.2013)	61/837,776	US		
item (2)				
item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

Furnishing the priority document(s):

☐ The **receiving Office** is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application(s) was filed with the Office which, for the purposes of this international application, is the receiving Office)* identified above as:

☐ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

☐ The **International Bureau** is requested to obtain from a digital library a certified copy of the earlier application(s) identified above, using, where applicable, the access codes(s) indicated below *(if the earlier application(s) is available to it from a digital library):*

☐ item (1) access code _____ ☐ item (2) access code _____ ☐ item (3) access code _____ ☐ other, see Supplemental Box

Restore the right of priority: the receiving Office is requested to restore the right of priority for the earlier application(s) identified above or in the Supplemental Box as item(s) (_____). *(See also the Notes to Box No. VI; further information must be provided to support a request to restore the right of priority.)*

Incorporation by reference: where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if more than one International Searching Authorities is competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):*

ISA / _____

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT
The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general)and the specific Notes to Box No.VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51*bis*.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

In relation to this international application:

NOVARTIS AG is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

an assignment from Kurt Alex HELDWEIN to NOVARTIS INSTITUTES FOR BIOMEDICAL RESEARCH INC., dated 19 March 2014;

an assignment from Igor SPLAWSKI to NOVARTIS INSTITUTES FOR BIOMEDICAL RESEARCH INC., dated 11 April 2014;

an assignment from Jennifer BROGDON to NOVARTIS INSTITUTES FOR BIOMEDICAL RESEARCH INC., dated 19 March 2014;

an assignment from William DOLE to NOVARTIS INSTITUTES FOR BIOMEDICAL RESEARCH INC., dated 19 March 2014;

an assignment from John TRAUGER to NOVARTIS INSTITUTES FOR BIOMEDICAL RESEARCH INC., dated 11 April 2014;

an assignment from Chonghui ZHANG to NOVARTIS INSTITUTES FOR BIOMEDICAL RESEARCH INC., dated 20 March 2014;

an assignment from NOVARTIS INSTITUTES FOR BIOMEDICAL RESEARCH INC. to NOVARTIS AG, dated 11 April 2014;

an assignment from Joshua GOLDSTEIN to NOVARTIS INSTITUTE FOR FUNCTIONAL GENOMICS, INC., dated 11 April 2014;

an assignment from NOVARTIS INSTITUTE FOR FUNCTIONAL GENOMICS, INC., to IRM LLC, dated 16 April 2014;

a certificate of merger from IRM LLC to NOVARTIS INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL LTD., dated 5 January 2015;

an assignment from NOVARTIS INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL LTD. to NOVARTIS AG, dated 5 January 2015

Box No. IX CHECK LIST for PAPER filings – this sheet is only to be used when filing an international application on **PAPER**

This international application **contains the following:**	Number of sheets
(a) request form PCT/RO/101 (including any declarations and supplemental sheets)	7
(b) description (excluding any sequence listing part of the description, see (f), below)	105
(c) claims	4
(d) abstract	1
(e) drawings (if any)	9
(f) sequence listing part of the description (if any)	
Total number of sheets	126

This international application is **accompanied by** the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):*	Number of items
1. ☐ fee calculation sheet	
2. ☐ original separate power of attorney	
3. ☐ original general power of attorney	
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number: _____	
5. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): _____	
6. ☐ Translation of international application into *(language)*:	
7. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	
8. ☐ copy in electronic form (Annex C/ST.25 text file) on physical data carrier(s) of the sequence listing, not forming part of the international application, which is **furnished only for the purposes of international search** under Rule 13*ter* *(type and number of physical data carriers)*	
9. ☐ a statement confirming that "the information recorded in electronic form submitted under Rule 13*ter* is identical to the sequence listing as contained in the international application" as filed on paper	
10. ☐ copy of results of earlier search(es) (Rule 12*bis*.1(a))	
11. ☐ other *(specify)*:	

Figure of the drawings which should accompany the abstract:	**Language of filing** of the international application:
1	English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Attorney Reg. No. (when applicable):

Paul J. Paglierani
Authorized Signatory, Novartis AG

Paul J. Paglierani

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:		2. Drawings:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		☐ received:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		☐ not received:
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

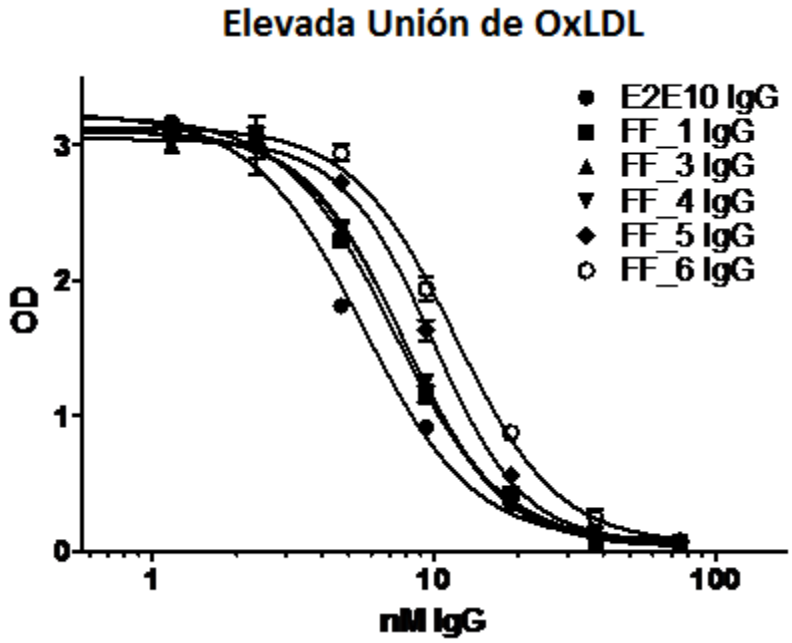

Elevada Unión de OxLDL
E2E10 IgG
FF_1 IgG
FF_3 IgG
FF_4 IgG
FF_5 IgG
FF_6 IgG
OD
3
2
1
0
1
10
100
nM IgG

FIG 1A

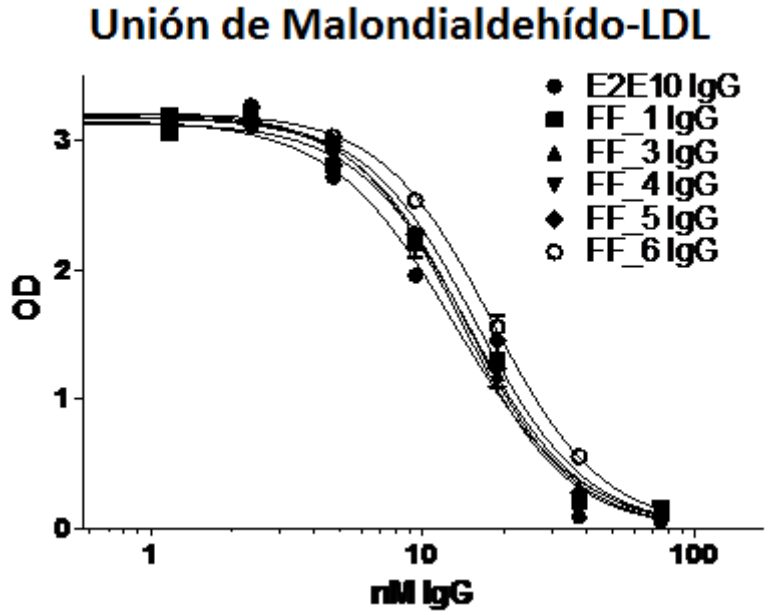

Unión de Malondialdehído-LDL
E2E10 IgG
FF_1 IgG
FF_3 IgG
FF_4 IgG
FF_5 IgG
FF_6 IgG
OD
3
2
1
0
1
10
100
nM IgG

FIG 1B

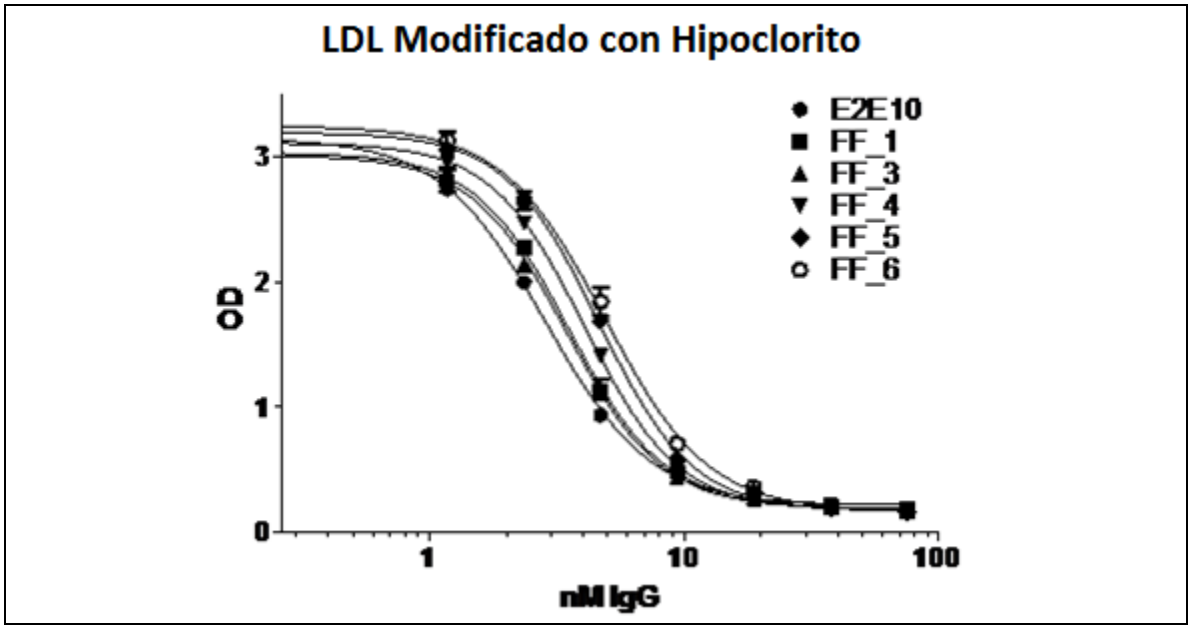

LDL Modificado con Hipoclorito
E2E10
FF_1
FF_3
FF_4
FF_5
FF_6
OD
0
1
2
3
1
10
100
nM IgG

FIG 1C

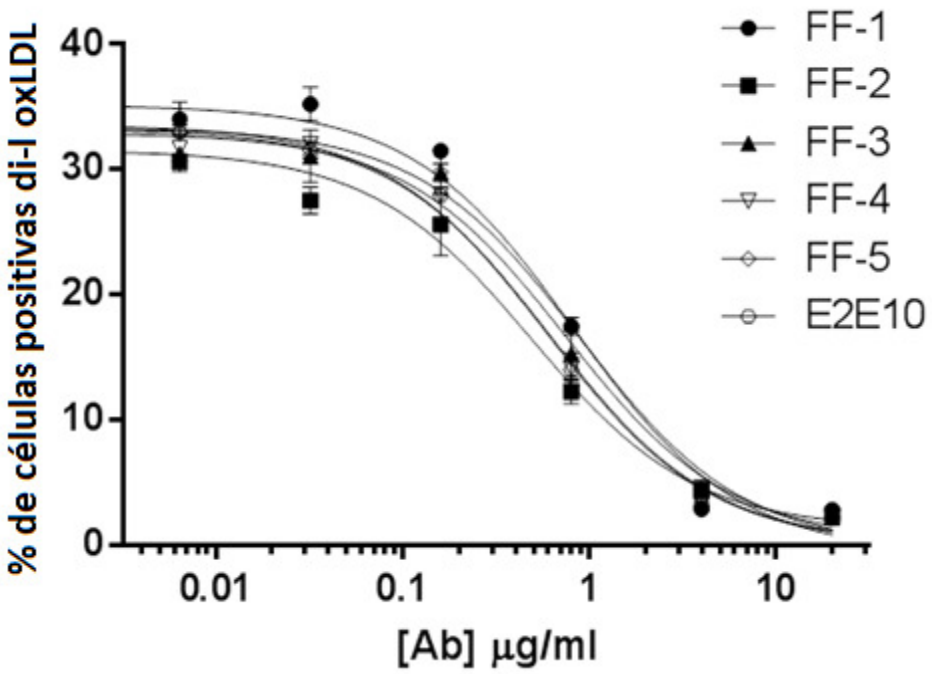

% de células positivas di-I oxLDL
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
[Ab] µg/ml
FF-1
FF-2
FF-3
FF-4
FF-5
E2E10

FIG 2

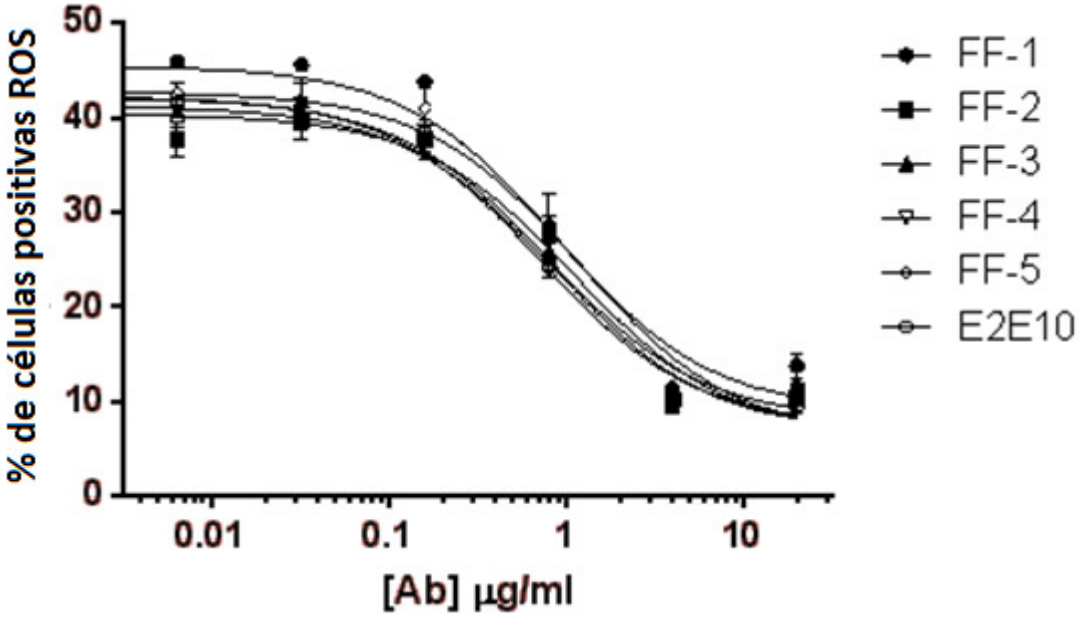

% de células positivas ROS
50
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
[Ab] µg/ml
FF-1
FF-2
FF-3
FF-4
FF-5
E2E10

FIG 3

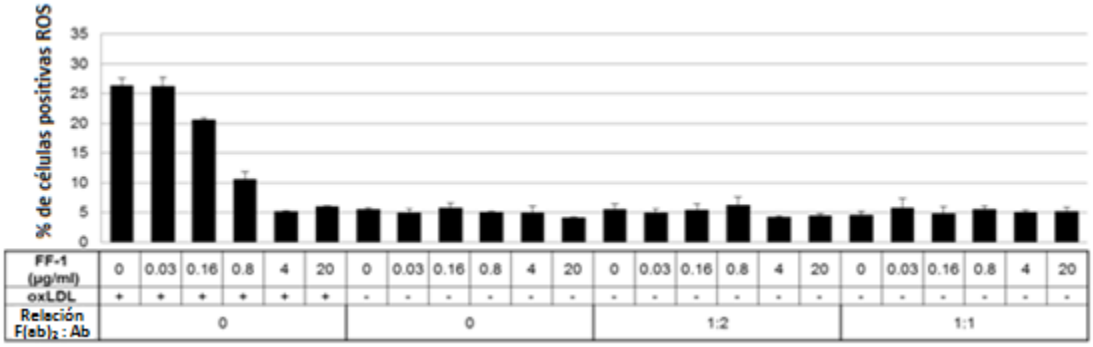

% de células positivas ROS
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-1 (µg/ml)
0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL
+ + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Relación F(ab)2 : Ab
0
0
1:2
1:1

FIG 4A

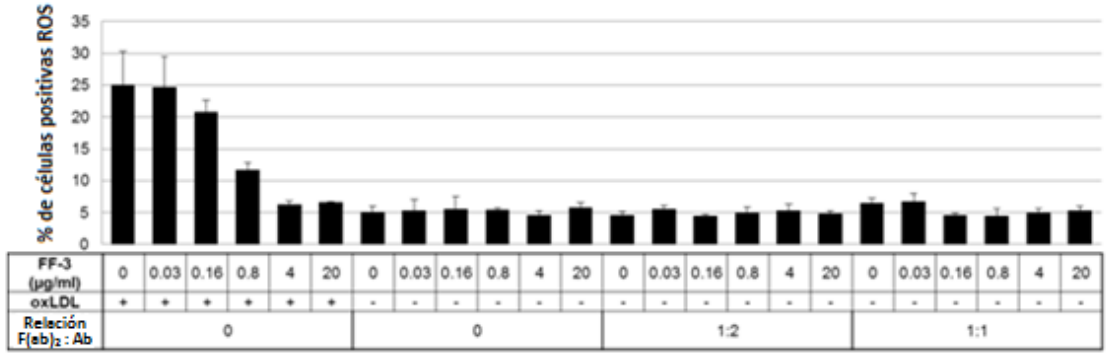

% de células positivas ROS
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-3 (µg/ml)
0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL
+ + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Relación F(ab)2 : Ab
0
0
1:2
1:1

FIG 4B

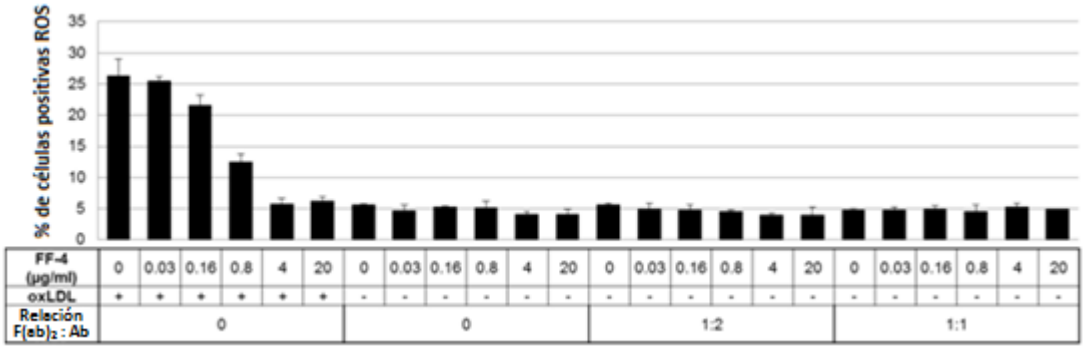

% de células positivas ROS
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-4 (µg/ml)
0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL
+ + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Relación F(ab)2 : Ab
0
0
1:2
1:1

FIG 4C

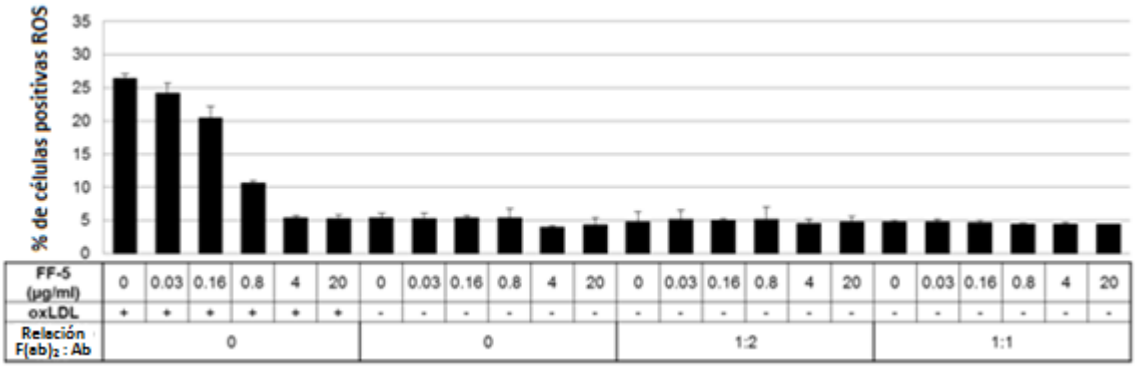

% de células positivas ROS
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-5 (µg/ml)
0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL
+ + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Relación F(ab)2 : Ab
0
0
1:2
1:1

FIG 4D

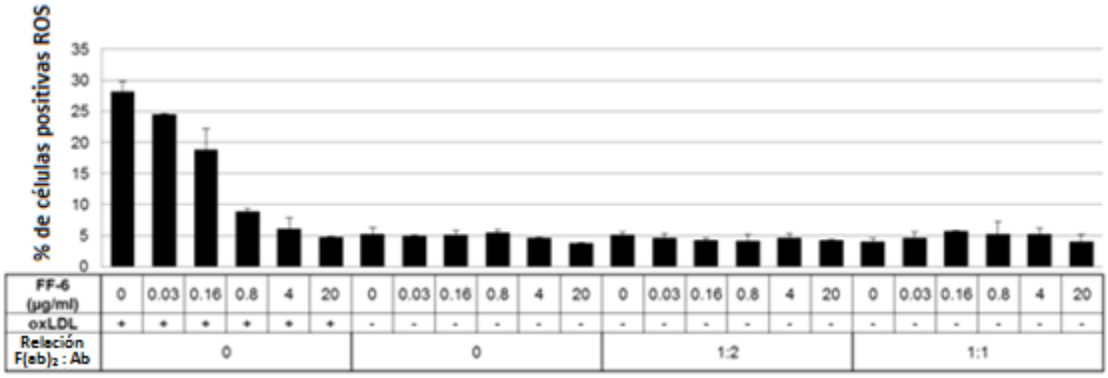

% de células positivas ROS
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-6 (µg/ml)
0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL
+ + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Relación F(ab)2 : Ab
0
0
1:2
1:1

FIG 4E

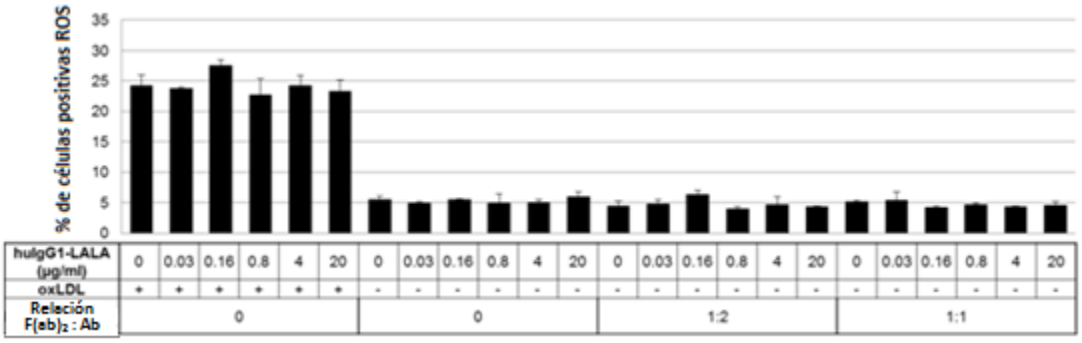

% de células positivas ROS
35
30
25
20
15
10
5
0
huIgG1-LALA (µg/ml)
0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL
+ + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Relación F(ab)2 : Ab
0
0
1:2
1:1

FIG 4F

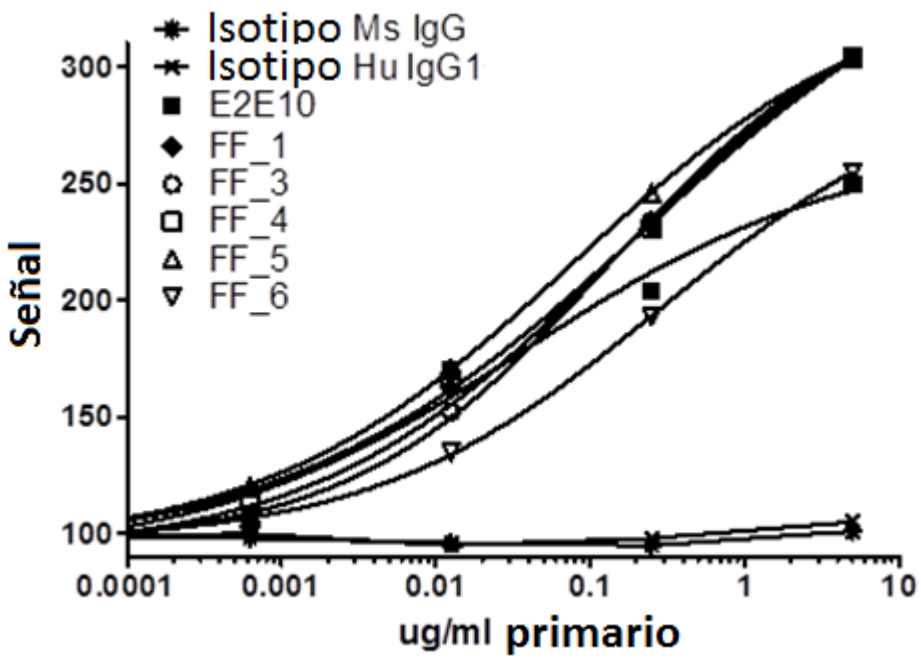

Isotipo Ms IgG
Isotipo Hu IgG1
E2E10
FF_1
FF_3
FF_4
FF_5
FF_6
Señal
300
250
200
150
100
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
ug/ml primario

FIG 5

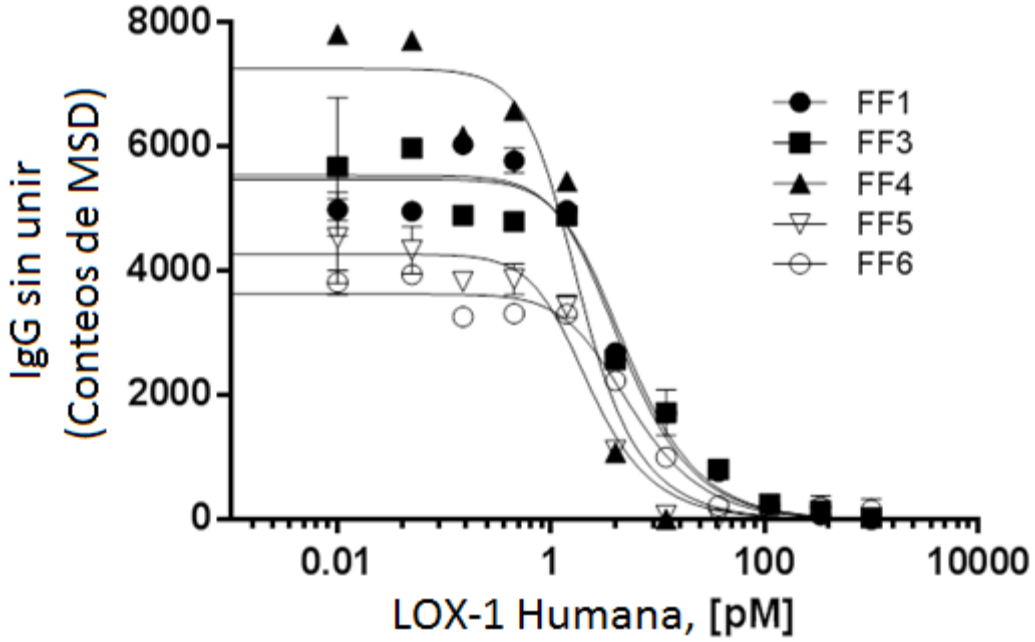

8000
6000
4000
2000
0
IgG sin unir
(Conteos de MSD)
0.01
1
100
10000
LOX-1 Humana, [pM]
FF1
FF3
FF4
FF5
FF6

FIG 6A

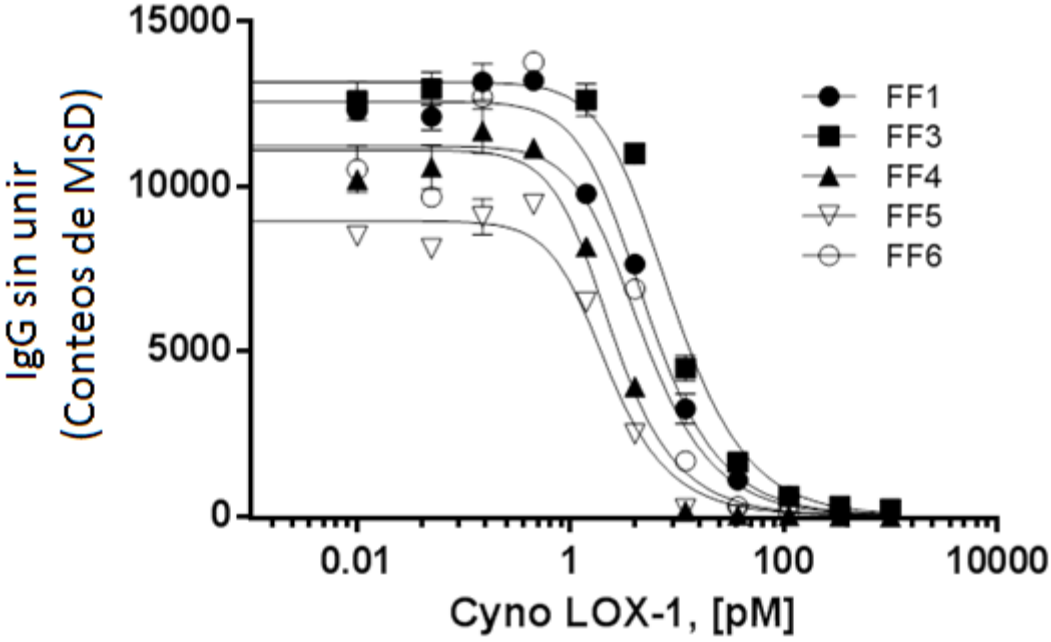

15000
10000
5000
0
IgG sin unir
(Conteos de MSD)
0.01
1
100
10000
Cyno LOX-1, [pM]
FF1
FF3
FF4
FF5
FF6

FIG 6B

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2014/043315

Kurt Alex HELDWEIN
100 Technology Square
Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Igor SPLAWSKI
100 Technology Square
Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos
Nacionalidad: Polaco

Jennifer BROGDON
250 Massachusetts Avenue
Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Joshua GOLDSTEIN
10675 John Jay Hopkins Drive
San Diego,
California 92121
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

William DOLE
220 Massachusetts Avenue
Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

John TRAUGER
100 Technology Square
Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Chonghui ZHANG
300 Technology Square
Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos
Nacionalidad: Chino

ANTICUERPOS DEL RECEPTOR 1 DE LDL OXIDADO SIMILAR A LECTINA Y MÉTODOS DE USO

FUDAMENTO DE LA INVENCIÓN

La enfermedad vascular sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. La identificación de los factores de riesgo de los fármacos disminuye en parte el riesgo vascular. Sin embargo, datos experimentales y clínicos sugieren que otros factores novedosos pueden explicar la mayor parte del riesgo para las enfermedades arteriales coronarias, cerebrales y periféricas y sus manifestaciones clínicas.

La recaptación no regulada de las partículas oxidativamente modificadas (oxLDL) de lipoproteína de baja densidad (LDL) por las células vasculares mediada por receptores no específicos se considera que es un paso crucial en la aterogénesis. Además de la mediación de la absorción de lípidos oxidados, los receptores no específicos pueden mediar la activación de vías de señalización pro-oxidantes y pro-inflamatorias que están implicados en la activación de las células endoteliales y los macrófagos, y que conducen a la progresión de la aterosclerosis y la erosión/ ruptura de placas, así como a la disfunción microvascular con la perfusión tisular alterada y liberación / utilización de de oxígeno, lo que resulta en infarto o isquemia de miembros inferiores.

El receptor 1 de la lipoproteína de baja densidad oxidado similar a lectina (LOX-1) es un receptor no específico multifuncional que se expresa en las células vasculares endoteliales, monocitos y macrófagos, células del músculo liso vascular y las plaquetas. LOX-1 se une a oxLDL y otros lípidos oxidados, dando como resultado la activación de la NADPH oxidasa y la generación de especies de oxígeno reactivas, incluyendo el anión superóxido. El anión superóxido inactiva el óxido nítrico endotelial y activa la MAP quinasa y NF-kB. Esto a su vez induce la expresión de moléculas de adhesión inflamatorias, citocinas y quimiocinas, así como metaloproteinasas de matriz y mediadores pro-apoptóticos.

Las consecuencias pro-inflamatorias, pro-oxidantes y pro-apoptóticas de señalización mediada por oxLDL - LOX-1 en células endoteliales, células de músculo liso y macrófagos se cree que desempeñan un papel clave en la progresión de la aterosclerosis y la inestabilidad de placas y también pueden desempeñar un papel en la

perfusión tisular y entrega de oxígeno no uniformes, que resultan en isquemia. Las consecuencias clínicas de la aterosclerosis avanzada y la isquemia de órganos incluyen: síndromes coronarios agudos, infarto de miocardio, angina inestable, accidente cerebrovascular, angina de pecho, claudicación e isquemia crítica de las extremidades. Además, el estrés oxidativo, la inflamación vascular y la resultante disfunción microvascular se cree que contribuyen a la enfermedad vascular diabética, incluyendo la nefropatía y retinopatía.

Mientras que los niveles de expresión de LOX-1 endotelial basal son relativamente bajos en condiciones fisiológicas normales, la expresión de LOX-1 vascular está regulada positivamente en condiciones asociadas con la enfermedad vascular. Se ha demostrado que los niveles de LOX-1 endotelial son aumentados por el estrés oxidativo, citoquinas proinflamatorias, proteína C-reactiva (CRP) y angiotensina II. LOX-1 también está regulado positivamente en el endotelio de animales ateroscleróticos y diabéticos y en monocitos / macrófagos aislados de pacientes con enfermedad vascular. La hiperglucemia, productos finales glicosilados avanzados y las lipoproteínas aterogénicas también regulan de manera positiva la expresión de LOX-1, proporcionando una relación mecanicista molecular específica entre la diabetes y las complicaciones vasculares.

La regulación positiva de LOX-1 por las citocinas y la PCR también sugiere una relación entre los factores de riesgo vascular convencional y la enfermedad vascular acelerada en pacientes de alto riesgo y diabéticos. Tanto PCR como LOX-1 soluble se encuentran elevados en pacientes con síndromes coronarios agudos. Los datos in vitro han demostrado que los anticuerpos anti-LOX-1 previenen la adhesión de monocitos mediada por CRP a células endoteliales aórticas humanas, soportando además un papel para LOX-1 como una molécula de adhesión relevante para la inflamación vascular (Li, Circulation Research 2004, 95 : 877-883).

El aumento de expresión de LOX-1 acoplado a niveles elevados de oxLDL y de otras lipoproteínas oxidadas induce la disfunción endotelial, en parte, mediante la activación de la NADPH oxidasa y la generación de especies reactivas de oxígeno. Experimentalmente, la disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo se puede revertir con un anticuerpo anti-LOX-1 neutralizante en ratones ApoE *Knockout* (Xu, Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology 2007, 27:871-877). En este estudio, el anticuerpo anti-LOX-1 aumentó tanto el óxido nítrico biodisponible como la expresión de proteína eNOS.

Datos experimentales in vivo indican que la sobreexpresión de LOX-1 vascular y de macrófagos en presencia de lípidos oxidados contribuye a la aterosclerosis y la disfunción microvascular mediante la activación de vías de señalización pro-oxidantes y pro-inflamatorias. Por lo tanto, se espera que la inhibición de lLOX-1 evite el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis y sus complicaciones agudas tales como síndromes coronarios agudos, infarto de miocardio y angina inestable. Además también se espera que la inhibición de LOX-1 mejore la disfunción microvascular, previniendo las manifestaciones clínicas de isquemia tisular tales como angina de pecho crónica, angina de pecho refractaria, claudicación e isquemia crítica de las extremidades.

La inhibición de LOX-1 es útil no sólo en el tratamiento y la prevención de la enfermedad vascular aterosclerótica, sino también en el tratamiento de otras condiciones patológicas caracterizadas por estrés oxidativo e inflamación, como la artritis reumatoide, varias formas de vasculitis, uveítis, degeneración macular relacionada con la edad, y prevención de eventos cardiovasculares en enfermedades autoinmunes (por ejemplo lupus eritematoso, psoriasis).

En resumen, los datos experimentales y clínicos sugieren que LOX-1 puede ser el receptor de lípido oxidado crítico que une el estrés oxidativo, la inflamación y la enfermedad vascular. Los anticuerpos anti-LOX-1 y fragmentos de unión a antígeno descritos en esta invención inhiben la unión de oxLDL y de otros lípidos/ lipoproteínas oxidados de LOX-1, evitando la activación de LOX-1, reduciendo así el estrés oxidativo vascular y la inflamación. Se espera que estos anticuerpos eviten y alivien las manifestaciones agudas y crónicas de la enfermedad vascular y eviten y mejoren otras enfermedades caracterizadas por el estrés oxidativo y la inflamación.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen al receptor 1 de LDL (lipoproteína de baja densidad) oxidado similar a lectina humana (en lo sucesivo, denominado a veces como "LOX-1"), y composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento que comprenden los mismos.

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados, o fragmentos de unión a antígeno, que se describen en el presente documento se unen a LOX-1, con una constante de disociación de equilibrio (KD) de menos o igual a 100 pM. Por ejemplo, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno que se describen en este documento pueden unirse a

LOX-1 humano con una Kd inferior o igual a 100 pM, inferior o igual a 50 pM, inferior o igual a 45 pM, inferior o igual a 40 pM, inferior o igual a 35 pM. Más específicamente, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno descritos en este documento también pueden unirse a LOX-1 humano con una K_D inferior o igual a 34 pM, medida por Biacore, o inferior o igual a 4 pM, tal como se mide por el ensayo de valoración con una solución de equilibrio (SET); y también puede unirse a LOX-1 de mono cinomolgus con una K_D inferior o igual a 53 pM, medida por Biacore, o inferior o igual a 4 pM, tal como se mide por SET.

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se une a LOX-1 humano y de mono cynomolgus. La invención también se refiere a un anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se une al dominio tipo lectina C-terminal de LOX-1 (dominio de unión a oxLDL). La invención también se refiere a un anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se une a un epítopo que comprende los residuos de aminoácidos 228 a 246 de LOX-1 humano (FRVRGAVSQTYPSGTCAYI; SEC ID No: 3). La presente invención también incluye un anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se une a un epítopo en LOX-1 humano que comprende los residuos de aminoácidos Arg229 y Arg231 de LOX-1 humano (SEC ID No: 1).

La presente invención también se refiere a un anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se une a LOX-1 y compite adicionalmente por la unión con un anticuerpo como se describe en la Tabla 1. La presente invención también se refiere además a un anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se une al mismo epítopo que un anticuerpo como se describe en la Tabla 1.

La afinidad de unión de los anticuerpos aislados y fragmentos de unión a antígeno descritos en este documento se puede determinar por valoración con una solución de equilibrio (SET). Los métodos para SET son conocidos en la técnica y se describen con más detalle a continuación. Alternativamente, la afinidad de unión de los anticuerpos aislados, o fragmentos, descritos en el presente documento se puede determinar mediante el ensayo de Biacore. Métodos para ensayos cinéticos Biacore son conocidos en la técnica y se describen en más detalle a continuación.

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados y fragmentos de de unión a antígeno descritos en este documento pueden usarse para inhibir la unión de LOX-1 a oxLDL (también conocido como LDL modificada).

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados y fragmentos de unión a antígeno descritos en este documento pueden usarse para inhibir la unión de LOX-1 a múltiples formas de LDL modificada (lipoproteínas de baja densidad) con una IC50 inferior o igual a 100 nM, inferior o igual a 50 nM, inferior o igual a 35 nM, inferior o igual a 25 nM, inferior o igual a 10 nM, o inferior o igual a 5,2 nM. Más específicamente, un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente puede inhibir la unión de LOX-1 a LDL modificada de manera oxidativa con sulfato de cobre (ox-LDLs) con una IC_{50} inferior o igual a 100 nM, inferior o igual a 50 nM, inferior o igual a 35 nM, inferior o igual a 25 nM, inferior o igual a 10 nM, o inferior o igual a 5,2 nM. Más específicamente, un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente puede inhibir la unión de LOX-1 a LDL modificada por malondialdehido con una IC_{50} inferior o igual a 100 nM, inferior o igual a 50 nM, inferior o igual a 35 nM, inferior o igual a 25 nM, inferior o igual a 20 nM, o inferior o igual a 18 nM. Más específicamente, un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente puede inhibir la unión de LOX-1 a LDL modificada con hipoclorito con una IC_{50} inferior o igual a 100 nM, inferior o igual a 50 nM, inferior o igual a 35 nM, inferior o igual a 25 nM, inferior o igual a 10 nM, o inferior o igual a 5 nM.

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se pueden usar para reducir la expresión de LOX-1 y/o NADPH oxidasa (NADPH es la forma reducida de NADP, o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato).

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden usarse para inhibir (por ejemplo, bloquear la inducción de) el estrés oxidativo, por ejemplo, a través de inhibir la unión de oxLDLs a LOX-1. Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden ser usados para bloquear la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) estimuladas con oxLDL. El estrés oxidativo vascular, que los anticuerpos aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden usar para prevenir, tratar, o mejorar, causa isquemia de

miocardio al inducir vasoconstricción, alterar la vasodilatación y aumentar la demanda de oxígeno.

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se pueden usar para restaurar los niveles de sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) a un estado saludable, homeostático. NOS endotelial es una sintasa de óxido nítrico que genera óxido nítrico (NO) en los vasos sanguíneos y está implicado en la regulación del tono vascular mediante la inhibición de la contracción del músculo liso y la agregación plaquetaria; su regulación a la baja se asocia con la disfunción celular endotelial relacionada con LOX-1.

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, como se describe en el presente documento pueden ser anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos o humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos Fv, fragmentos F(ab')2, o fragmentos scFv, y/o isotipos de IgG.

Los anticuerpos anti-LOX-1 aislados, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, como se describe en el presente documento incluyen una estructura marco en la cual un aminoácido ha sido sustituido en la estructura de anticuerpo a partir de las respectivas secuencias de la línea germinal humana VH o VL.

Otro aspecto de la invención incluye un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que tiene secuencias de cadena pesada y ligera total de Fabs descritas en la Tabla 1. Más específicamente, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión al antígeno de los mismos puede tener secuencias de cadena pesada y ligera de Fab FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6.

Un aspecto adicional de la invención incluye un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que tiene secuencias de de dominio variable de cadena pesada y ligera de las Fabs descritas en la Tabla 1. Más específicamente, el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de los mismos pueden tener la secuencia de dominio variable de cadena pesada y ligera de Fab FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6.

La invención también se relaciona con un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que incluye además una CDR1 de cadena pesada seleccionada del

grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 8, 28, 48, y 68, y 88, una CDR2 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, y 89; una CDR3 de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 10, 30, 50, 70, y 90, en el que el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo se une a LOX-1 humano. En otro aspecto, tal anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno de los mismo incluye además una CDR1 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 18, 38, 58, y 78, y 98, una CDR2 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, y 99; una CDR3 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, y 100.

La invención también se relaciona con un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluye además una CDR1 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 18, 38, 58, y 78, y 98, una CDR2 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, y 99; una CDR3 de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, y 100, en el que el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo se une a LOX-1 humano.

La invención también se refiere a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que se une a LOX-1 que tiene HCDR1, HCDR2, y HCDR3 y LCDR1, LCDR2, y LCDR3, en donde HCDR1, HCDR2, y HCDR3 comprende SEQ ID NOs: 8, 9, y 10, y LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprende SEQ ID NOs: 18, 19, y 20; o HCDR1, HCDR2, y HCDR3 comprende SEQ ID NOs: 28, 29, y 30, y LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprende SEQ ID NOs: 38, 39, y 40; o HCDR1, HCDR2, y HCDR3 comprende SEQ ID NOs: 48, 49, y 50, y LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprende SEQ ID NOs: 58, 59, y 60; o HCDR1, HCDR2, y HCDR3 comprende SEQ ID NOs: 68, 69, y 70, y LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprende SEQ ID NOs: 78, 79, y 80; o HCDR1, HCDR2, y HCDR3 comprende SEQ ID NOs: 88, 89, y 90, y LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprende SEQ ID NOs: 98, 99, y 100.

La invención también se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que tiene HCDR1, HCDR2, HCDR3 de la cadena pesada variable de SEC ID No: 14, 34, 54, 74, o 94 y la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de la cadena ligera variable de SEQ ID NO: 24, 44, 64, 84, o 104, como se define por Chothia. En otro aspecto de la invención, el

anticuerpo o fragmento de unión a antígeno pueden tener la HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de la secuencia del dominio variable de cadena pesada de la SEC ID Nos: 14, 34, 54, 74, o 94 y la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, o 104, como se define por Kabat.

En un aspecto de la invención, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo incluye una secuencia de dominio variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No: 14, 34, 54, 74, y 94. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno pueden además comprender una secuencia de dominio variable de cadena ligera en la que el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera se combinan para formar un sitio de unión a antígeno para LOX-1. En particular, la secuencia del dominio variable de cadena ligera puede seleccionarse de las SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, y 104, en el que dicho anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo se une a LOX-1.

La invención también se relaciona con un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluye una secuencia de dominio variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, y 104, en el que dicho anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo se une a LOX-1 humana. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno pueden comprender además una secuencia de dominio variable de cadena pesada en la que el dominio variable de cadena ligera y dominio variable de cadena pesada se combinan para formar un sitio de unión a antígeno para LOX-1.

En particular, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a LOX-1, puede tener dominios variables de cadena pesada y ligera que comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 14 y 24; 34 y 44; 54 y 64; 74 y 84; o 94 y 104, respectivamente.

La invención también se relaciona con un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluye un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74, y 94, en el que dicho anticuerpo se une a LOX-1. En un aspecto, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo también incluye un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de

identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, y 104. En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno tiene una HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se define por Kabat y como se describe en la Tabla 1.

La invención también se relaciona con un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluye un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, y 104, en donde dicho anticuerpo se une a LOX-1.

En otro aspecto de la invención, el anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se une a LOX-1 puede tener una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16, 36, 56, 76, o 96. El anticuerpo aislado también puede incluir una cadena ligera que puede combinarse con la cadena pesada para formar un sitio de unión a antígeno de LOX-1 humana. En particular, la cadena ligera puede tener una secuencia que comprende la SEC ID No: 26, 46, 66,86, o 106. En particular, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que se une a LOX-, puede tener una cadena pesada y una cadena ligera que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 16 y 26; 36 y 46; 56 y 66; 76 y 86; o 96 y 106, respectivamente.

La invención también se relaciona con un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluye una cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 16, 36, 56, 76, y 96, en el que dicho anticuerpo se une a LOX-1. En un aspecto, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo también incluye una cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 26, 46, 66, 86 or 106.

La invención también se relaciona con un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluye una cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 26, 46, 66, 86, o 106, en donde dicho anticuerpo se une a LOX-1.

La invención también se refiere a composiciones que comprenden el anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente

documento. Además, composiciones de anticuerpos en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Específicamente, la invención incluye además composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno del mismo de la Tabla 1, tales como, por ejemplo anticuerpo FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación de dos o más de los anticuerpos aislados o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la Tabla 1.

La invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada variable que tiene una secuencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, y 94. En particular, el ácido nucleico tiene una secuencia de al menos 90% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 15, 35, 55, 75 y 95. En un aspecto adicional de la invención, la secuencia es SEQ ID NOs: 15, 35, 55, 75, y 95.

La invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica la cadena ligera variable que tiene una secuencia seleccionada entre las SEQ ID No: 25, 45, 65, 85, y 105. En particular, el ácido nucleico tiene una secuencia de al menos 90% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 25, 45, 65, 85 y 105. En un aspecto adicional de la invención, la secuencia es SEQ ID NOs: 25, 45, 65, 85, y 105.

La invención también se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que incluye un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 25, 45, 65, 85, y 105.

La invención también se refiere a un vector que incluye una o más de las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento.

La invención también se refiere a una célula huésped aislada que incluye una secuencia de ADN recombinante que codifica una cadena pesada del anticuerpo descrito anteriormente, y una segunda secuencia de ADN recombinante que codifica una cadena ligera del anticuerpo descrito anteriormente, en el que dichas secuencias de ADN están unidas operativamente a un promotor y son capaces de ser expresadas en la célula

huésped. Se contempla que el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal humano. También se contempla que la célula huésped es una célula de mamífero no humano.

La invención también se refiere a un método de reducción de expresión de LOX-1, y/o expresión de NADPH oxidasa, en el que el método incluye la etapa de poner en contacto una célula con una cantidad eficaz de una composición que comprende el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo descritos en este documento.

La invención también se refiere a un método de inhibición de la unión de la LDL oxidada (oxLDL) a un receptor de LDL humano oxidado (LOX-1) o inhibir la incorporación mediada por el receptor de LDL oxidada humana de LDL oxidada en las células, en el que el método incluye la etapa de poner en contacto una célula con una cantidad eficaz de una composición que comprende el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en este documento.

Se contempla que la célula es una célula humana. Se contempla además que la célula está en un sujeto. En un aspecto, se contempla que la célula es una célula endotelial. En otras formas de realización, la célula puede ser uno o más de los macrófagos, monocitos, células dendríticas, células del músculo liso vascular (SMC), condrocitos, y miocitos cardíacos. Se contempla además que el sujeto es humano.

La invención también se refiere a un método de tratar, mejorar, o prevenir un trastorno asociado con LOX-1 en un sujeto, en el que el método incluye la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende el anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de los mismos descritos en el presente documento. En un aspecto, el trastorno asociado con LOX-1 se asocia con claudicación (por ejemplo, la claudicación intermitente, Claudicación Rutherford Clase II/III). En un aspecto, el trastorno asociado con LOX-1 está asociado con angina de pecho (por ejemplo, angina de pecho refractaria). Se contempla que el sujeto es humano.

Cualquiera de los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno anteriores de los mismos pueden ser un anticuerpo monoclonal o fragmentos de unión a antígeno del mismo.

DEFINICIONES

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención.

El término "proteína LOX-1" o "antígeno LOX-1 " o "LOX-1" o "Lox1" se utilizan indistintamente, y se refiere a proteína del Receptor 1 de LDL oxidado similar a lectina en diferentes especies Por ejemplo, LOX-1 humano tiene la secuencia tal como se establece en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1), y se ha descrito en informes y publicaciones anteriores (Nature, Vol. 386, p 73-77, 1997; Genomics, Vol. 54, No 2, p 191-199, 1998;. Biochem. J., Vol. 339, Part 1, P. 177-184, 1999; Numero de Acceso Genbank. NP 002534). Se trata de un receptor no específico clase E, que media la recaptación de oxLDL por las células vasculares y señalización de oxLDL en células vasculares, y, como tal, es un mediador de los efectos tóxicos de oxLDL. LOX-1 se expresa en la superficie de las células endoteliales vasculares y ha sido implicado en la acumulación de monocitos y macrófagos en células endoteliales vasculares.

Además, en el contexto de esta invención, el término "LOX-1" incluye mutantes del receptor de LDL oxidada humana natural, que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la de la estructura primaria nativa (secuencia de aminoácidos) descrita en los informes mencionados anteriormente. Aquí, el término "mutantes del receptor de LDL oxidada humana natural que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos" se refiere a tales proteínas mutantes.

Se ha mostrado que múltiples formas de LDL modificada formada in vitro y/o in vivo se unen a LOX-1. Tal como se usa en el presente documento, el término "LDL modificada" y "LDL oxidada" (y "oxLDL") se usan indistintamente para describir lipoproteínas de baja densidad que se oxidan por células, tales como células endoteliales vasculares, en combinación con diversos factores químicos y físicos (por ejemplo, calor). LDL se oxida, por ejemplo, dentro de la pared vascular en condiciones aterogénicas para formar oxLDL. El término "LDL modificada" puede abarcar los siguientes**:** LDL oxidado, LDL modificada por oxidación con sulfato de cobre, LDL acetilo, LDL clorada (por ejemplo, LDL modificada a través de una reacción de cloración química), LDL modificada con mieloperoxidasa, LDL modificada con hipoclorito, LDL de succinilo, y

LDL modificada con malondialdehído (es decir, LDL modificada a través de la reacción con malondialdehído, que se produce in vivo como consecuencia del estrés oxidativo).

El término "anticuerpo" como se utiliza en la presente se refiere a un anticuerpo entero y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadena simple del mismo. Un anticuerpo entero es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones variables (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs dispuestas desde el extremo amino al extremo 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 unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos huésped o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

El término “porción de unión a antígeno” o “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo como se utiliza en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que retiene la capacidad para unirse específicamente a un antígeno dado (ej., receptor de LDL oxidada humana (LOX-1)). Las funciones de unión a antígenos de un anticuerpo pueden realizarse por fragmentos de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de unión contemplados dentro del término porción de unión al antígeno o fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento $F(ab)_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de bisagra; un fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un solo brazo de un

anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de único dominio (dAb) (Ward, (1989) Nature 341: 544-546), que consta de un dominio VH o un dominio VL; y una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador peptídico artificial que les permite ser hechos como una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird, (1988) Science 242:423-426; y Huston, (1988) Proc Natl Acad . Sci. 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla incluyen una o más porciones de unión a antígeno o fragmentos de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan según la utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

Los fragmentos de unión al antígeno también se pueden incorporar en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y scFv bis-(véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, (2005) Nature Biotechnology 23:19, 1126-1136) . Las porciones de unión al antígeno de los anticuerpos pueden ser injertadas en andamios con base en polipéptidos tales como la fibronectina tipo III (Fn3) (véase la patente de EE.UU. No. 6.703.199, que describe monocuerpos polipeptídicos de fibronectina).

Los fragmentos de unión al antígeno se pueden incorporar en moléculas de cadena única que comprende un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos complementarios de cadena ligera, forman un par de regiones de unión al antígeno (Zapata., (1995) Protein Eng. 8:1057-1062; y Patente de EE.UU. No. 5.641.870).

Como se utiliza en la presente, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigénicos únicos. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del anticuerpo "brazo" interactúa a través de débiles fuerzas no covalentes con el antígeno en numerosos sitios, entre más interacciones, más fuerte es la afinidad. Como se usa en la presente, el término "alta afinidad" de un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo (por ejemplo: un fragmento Fab)

generalmente se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, que tiene una K_D de 10^{-9}M o menos.

El término "aminoácido" se refiere a que ocurre naturalmente y aminoácidos sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican más tarde, por ejemplo, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un ácido amino de origen natural, es decir, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Miméticos de aminoácidos se refieren a los compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero funciona de manera similar que un aminoácido de origen natural.

El término “especificada de unión” como se utiliza en la presente se refiere a la capacidad de un anticuerpo individual que combina sitio para reaccionar con solo un determinante antigénico.

La frase “específicamente (o selectivamente) se une” a un anticuerpo (ej., anticuerpo de unión a LOX-1) se refiere a una reacción de unión que es determinativa de la presencia de un antígeno cognado (ej., un LOX-1 humano o LOX-1 cinomólogo) en una población heteróloga de proteínas y otros biológicos. Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se utilizan indistintamente en la presente con el término “un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno”.

El término "mediado por LOX-1 " se refiere al hecho de que el receptor de LOX-1 media la respuesta celular tras la unión de un ligando de LOX-1, por ejemplo, oxLDL, a LOX-1 en la superficie celular, lo cual disparala célula para aumentar la producción de ciertas moléculas proinflamatorias. El término "gen pro-inflamatoriao" se refiere a un gen que codifica cualquier molécula, tal como, pero no limitado a, una citoquina, una

quimioquina, o una molécula de adhesión celular, que desempeña un papel en un proceso inflamatorio. Los genes "pro-inflamatorios" de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, interleucina-8 (IL-8), molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y la proteína quimiotáctica de monocitos -1 (MCP-1).

Un "trastorno asociado con LOX-1, "condición asociada a LOX-1", "enfermedad o condición asociada con niveles elevados de LOX-1," o términos similares como se usan aquí, se refieren a cualquier número de condiciones o enfermedades en las que los niveles de proteína LOX-1 son aberrantemente altos y/o en los que se busca una reducción de los niveles de proteína LOX-1. Estas condiciones incluyen pero no se limitan a trastornos cardiovasculares, disfunción celular endotelial, trastornos de células endoteliales, aterosclerosis, arteriosclerosis, hipertensión, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, diabetes mellitus, deficiencia de óxido nítrico, infarto de miocardio, estrés oxidativo vascular, isquemia miocárdica, isquemia-reperfusión, sepsis, nefropatía diabética, enfermedad renal, cardiomiopatía, insuficiencia cardiaca, enfermedad arterial periférica, enfermedad cardiaca coronaria, claudicación (por ejemplo, claudicación intermitente, Claudicación Rutherford Clase II / III), enfermedad de la arteria periférica (PAD), angina de pecho (por ejemplo, angina de pecho refractaria), enfermedad arterial coronaria (CAD) (por ejemplo, debido a la aterosclerosis de las arterias que alimentan el corazón), accidente cerebrovascular, y vasodilatación anormal dependiente del endotelio.

"Disfunción de células endoteliales," como se usa aquí, significa la incapacidad de una célula endotelial para mantener su función normal. El endotelio desempeña un papel crítico en la regulación del tono y crecimiento vascular liso , permeabilidad vascular, respuesta inflamatoria, coagulación, y adhesión de plaquetas. Ejemplos no limitantes de la función celular endotelial incluyen mantenimiento del tono vascular equilibrado, inhibición de la trombosis, inhibición de los procesos pro-inflamatorios, mantenimiento de la integridad vascular (por ejemplo, no permeabilidad de la vasculatura), y mantenimiento de un estado anti-proliferativo tanto en el endotelio como en células de músculo liso. Condiciones comunes y factores de riesgo que predisponen a la aterosclerosis, como dislipidemia, hipertensión, diabetes y tabaquismo están todos asociados con la disfunción endotelial, que promueve el desarrollo, progresión y complicaciones de la aterosclerosis. La disfunción endotelial en general ha sido evaluada como la vasodilatación alterada dependiente del endotelio. Esto supone que la

vasodilatación dependiente del endotelio es un marcador sustituto para otras funciones endoteliales importantes. La base para esta suposición es la observación de que el óxido nítrico derivado del endotelio, sintetizado por la NO sintasa endotelial (eNOS) a partir de L-arginina, media la vasodilatación dependiente del endotelio y otras funciones vasculoprotectoras endoteliales. Una creciente base de datos clínicos sugieren que la disfunción endotelial (vasodilatación alterada dependiente del endotelio) está estrechamente asociada con eventos adversos cardiovasculares mayores, incluyendo isquemia miocárdica e infarto, lsíndromes coronarios agudos, claudicación e isquemia crítica de las extremidades, ataques isquémicos transitorios y accidentes cerebrovasculares.

La acumulación de datos experimentales también sugiere que la disponibilidad de óxido nítrico derivada de wNOS endotelial y endocadial no sólo puede conducir a la la disfunción y remodelación ventricular izquierda anormal contribuyendo al desarrollo y progresión de la insuficiencia cardíaca.

Un "trastorno de células endoteliales," tal como se usa en el presente documento, es cualquier trastorno que se caracteriza por disfunción de células endoteliales. Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos que se caracterizan por la disfunción de las células endoteliales incluyen trastornos angiogénicos tales como cánceres que requieren neovascularización para apoyar el crecimiento tumoral, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunes, malformaciones vasculares, síndrome de DiGeorge, HHT, hemangioma cavernoso, arteriopatía de trasplante, estenosis de acceso vascular asociado con hemodiálisis, vasculitis, vasculitidis, trastornos inflamatorios vasculares, aterosclerosis, obesidad, psoriasis, verrugas, dermatitis alérgica, cicatrices queloides, granulomas piógenos, enfermedad ampollosa, sarcoma de Kaposi, síndrome vítreo hiperplásico persistente, retinopatía del prematuro, neovascularización coroidea, degeneración macular, retinopatía diabética, neovascularización ocular, hipertensión pulmonar primaria, asma, pólipos nasales, enfermedad intestinal inflamatoria y periodontal, ascitis, adhesiones peritoneales, anticoncepción, endometriosis, sangrado uterino, quistes ováricos, hiperestimulación ovárica, artritis, artritis reumatoide, reumatismo articular crónico, sinovitis, osteoartritis, osteomielitis, formación de osteofitos, sepsis y fuga vascular. La disfunción de células endoteliales se puede determinar usando ensayos conocidos en la técnica, incluyendo la detección de la

expresión aumentada de moléculas de adhesión endoteliales o disminución de la expresión o la actividad biológica de la sintasa de óxido nítrico (eNOS).

"Claudicación", como se usa aquí, incluye claudicación severa y otros términos similares, y describe un impedimento de movilidad y alta necesidad médica no cubierta. La claudicación es una condición caracterizada por una menor isquemia de las extremidades, causando fatiga muscular, dolor por el esfuerzo se alivia con el reposo, movilidad limitada y reducida calidad de vida, y es causada por la aterosclerosis y vasodilatación anormal (por ejemplo, alterada) dependiente del endotelio. Su prevalencia en los EE.UU. es de 8-12 millones de pacientes. Entre pacientes con claudicación intermitente, el 7% se someterá a una cirugía de derivación de extremidades inferiores, 4% requerirá amputaciones mayores, y el 16% desarrollará empeoramiento de claudicación. Los eventos cardiovasculares, como el infarto de miocardio y accidente cerebrovascular, se producen en el 20% de los enfermos de claudicación grave de más de 5 años. El tratamiento actual es quirúrgico y el tratamiento a través de medios menos invasivos, como la administración de los anticuerpos anti-LOX-1 de la invención, representaría un enorme avance terapéutico.

"La angina refractaria," como se usa aquí, es una condición caracterizada por dolor en el pecho debido a la isquemia del músculo cardíaco, por lo general debido a la obstrucción o espasmo de las arterias coronarias (por ejemplo, de la enfermedad de las arterias coronarias), con síntomas debilitantes, actividad física muy limitada y la mala calidad de vida. Los 1-1.8 millones de pacientes que sufren de angina de pecho refractaria en EE.UU. experimentan aumento de la mortalidad cardiovascular, a razón de 10% por año; al menos 100.000 nuevos casos de angina refractaria surgen por año.

El término "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable) está unido a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y / o especies o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc; o (b) la región variable, o una parte de la misma, se ve alterada, sustituida o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada. Por ejemplo, un anticuerpo de ratón puede ser modificado mediante la sustitución de su región

constante por la región constante de una inmunoglobulina humana. Debido a la sustitución con una región constante humana, el anticuerpo quimérico puede conservar su especificidad en el reconocimiento del antígeno, mientras tiene antigenicidad reducida en humanos en comparación con el anticuerpo de ratón original.

El término "variante modificada de manera conservativa" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como a secuencias de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, las variantes modificadas conservadoramente se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas de ácido, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde se especifica una alanina mediante un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es comúnmente el único codón para metionina, y TGG, que es comunmente el único codón para triptófano) puede ser modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Para las secuencias de polipéptidos, "variantes modificadas de manera conservativa" incluyen sustituciones individuales, deleciones o adiciones a una secuencia de polipéptidos lo cual da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas conservativamente son adicionales a y no excluyen las variantes polimórficas, homólogos interespecies, y alelos de la invención. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M),

Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T), y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)). En algunas realizaciones, el término "modificaciones de secuencia conservativas" se utiliza para referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan significativamente o alteran las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos.

El término “epítopo” significa un determinante proteico capaz de unión específica a un anticuerpo. Los epítopos consisten generalmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y pueden tener característas estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros y no a los últimos se pierde en presencia de solventes desnaturalizantes.

El término "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente, incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones variables como CDR se derivan a partir de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva a partir de tales secuencias humanas, ej., secuencias de línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica a sitio in vitro o por mutación somática in vivo).

El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una sola especificidad de unión que tienen regiones variables en las que tanto las regiones variables como las regiones CDR se derivan de secuencias humanas. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada .

Un anticuerpo “humanizado” es un anticuerpo que retiene la reactividad de un anticuerpo no humano mientras es menos inmunogénico en humanos. Esto puede

lograrse por ejemplo, al retener las regiones CDR no humanas y reemplazar las restantes partes del anticuerpo por sus contrapartes humanas (es decir, la región constante así como las porciones variables de la región variable). Vease, por ejemplo Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65-92, 1988; Verhoeyen *et al.*, Science, 239:1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991; and Padlan, Molec. Immun., 31:169-217, 1994. Otros ejemplos de tecnología de ingeniería humana incluyen, pero no se limitan a Xoma technology divulgada en US 5,766,886.

Los términos "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, identidad de 60%, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad sobre una región especificada, o, cuando no se especifica, sobre toda la secuencia), cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, existe identidad en una región que tiene al menos aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferiblemente en una región que tiene de 100 a 500 o 1000 nucleótidos o más (o 20, 50, 200 o más aminoácidos ácidos) de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en una computadora, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Los parámetros predeterminados del programa se puede utilizar, o parámetros alternativos pueden ser designados. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces las identidades de secuencia por ciento para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se utiliza en la presente, incluye la referencia a un segmento de uno cualquiera del número de posiciones contiguas

seleccionadas del grupo que consta de 20 a 600, por lo general 50 a 200 aproximadamente, más habitualmente 100 a 150 aproximadamente en el cual una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias están alineadas óptimamente. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482 c, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU. 85:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Brent ., (2003) Current Protocols in Molécular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou ed., 2003)).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul, (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; y Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990, respectivamente. El software para realizar el análisis BLAST está públicamente disponible a través del Centro Nacional de Información de Biotecnología. Este algoritmo implica primero la identificación de pares de secuencias de alta puntuación (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que bien sea corresponden o satisfacen algunos puntajes T umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T conocido como el umbral de puntuación de palabra adyacente (Altschul, Supra). Estas coincidencias de palabra adyacente inicial actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largos que los contienen. Los hits de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como la puntuación de alineamiento acumulativa pueda ser aumentada. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre> 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, una matriz de puntuación se utiliza para calcular la puntuación

acumulativa. La extensión de los hits de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X de su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa ; o el final de cada secuencia es alcanzado. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:5873-5787, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0.2, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.01, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 0.001.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci. 4:11-17 (1988)) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2,0), utilizando una tabla de residuo de peso PAM120, una penalización de longitud de brecha de 12 y una penalización por brecha de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol, Biol. 48:444-453 (1970)) que ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando ya sea una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Aparte de porcentaje de identidad de secuencia se indicó anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico tiene inmunológicamente reactividad cruzada con los anticuerpos dirigidos contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Así, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Sin embargo, otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que los mismos cebadores pueden usarse para amplificar la secuencia.

El término "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a LOX-1 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a a antígenos distintos de LOX-1). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a LOX-1 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

El término “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpos (*ej.*, IgM, IgE, IgG tal como IgG1 o IgG4) que es proporcionado por los genes de región constante de cadena pesada. Isotipo también incluye versiones modificadas de una de estas clases, donde las modificaciones se han realizado para alterar la función Fc, por ejemplo, para aumentar o reducir las funciones efectoras o unión a los receptores Fc.

El término "K_{assoc}" o "K_a", como se utiliza en la presente, se refiere a la tasa de asociación de una determinada interacción anticuerpo-antígeno, mientras que el término "k_{dis}" o "K_d", como se utiliza en la presente, se refiere a la tasa de disociación de una determinada interacción anticuerpo-antígeno. El término "K_D", como se utiliza en la presente, se refiere a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la proporción de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Valores K_D de los anticuerpos se pueden determinar usando métodos bien establecidos en la técnica. Métodos para determinar K_D de un anticuerpo incluyen medir la resonancia de plasmón

superficial utilizando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®, o medir la afinidad en solución por evaluación de solución en equilibrio (SET).

Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” como se utilizan en la presente se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad de unión y afinidad para un epítopo particular.

El término "ácido nucleico" se usa en la presente de manera intercambiable con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces de esqueleto modificado, que son sintéticos, de origen natural, y que se producen de forma no natural, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de una manera similar a la nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos 2-O-metilo, ácidos péptido-nucleicos (PNA).

A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácidos nucleicos particular abarca también implícitamente variantes modificadas conservativamente de los mismos (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, como se detalla a continuación, sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir por generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer, (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985; y Rossolini, Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994).

El término "operativamente unido" se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos polinucleótidos (por ejemplo, ADN). Típicamente, el término se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora transcripcional a una secuencia transcrita. Por ejemplo, una secuencia promotora o potenciadora está unida operativamente a una secuencia codificadora si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificadora en una célula hospedera apropiada u otro sistema de expresión.

Generalmente, secuencias reguladoras transcripcionales promotoras que están unidas operativamente a una secuencia transcrita están físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es decir, son de actuación cis. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras transcripcionales, tales como potenciadoras, no necesitan estar físicamente contiguas o situadas en las proximidades de las secuencias codificadoras cuya transcripción mejoran.

El término "optimizado" como se utiliza en la presente se refiere a una secuencia de nucleótidos que ha sido alterada para codificar una secuencia de aminoácidos utilizando codones que son preferidos en la producción de células o un organismo, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de Pichia, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada es diseñada para retener completamente o tanto como sea posible la secuencia de aminoácidos originalmente codificada por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como la secuencia "precursora". Las secuencias optimizadas en este documento han sido modificadas para tener codones que son preferidos en las células de mamíferos. Sin embargo, la expresión optimizada de estas secuencias en otras células eucariotas o células procariotas, también se prevé en el presente documento. Las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias nucleotídicas optimizadas también se conocen como optimizadas.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. A menos que se indique otra cosa, una secuencia polipeptídica particular abarca también implícitamente variantes modificadas de manera conservativa de la misma.

El término "anticuerpo humano recombinante ", como se utiliza en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosomal para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos, anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante, combinatoria de anticuerpos

humanos, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica corte y empalme de la totalidad o una porción de un gen de inmunoglobulina humana, secuencias a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones variables y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a mutagénesis in vitro (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática in vivo) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con secuencias VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de anticuerpos de línea germinal humana in vivo.

El término “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”) se refiere a una célula en la cual un vector de expresión recombinante se ha introducido. Se debe entender que tales términos tienen el propósito de referirse no solo a la célula objetivo particular sino a la progenie de tal célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones posteriores debido a bien sea la mutación o influencias ambientales, tal progenie no puede, en realidad, ser idéntica a la célula precursora, pero están aún incluidas dentro del alcance del término “célula huésped” como se utiliza en la presente.

El término "sujeto" incluye animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados (ej.: Mamíferos y no mamíferos) tales como, primates no humanos (ej.: monos cinomolgus, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, y réptiles. Excepto cuando se indica, los términos "paciente" o "sujeto" se usan en la presente de forma intercambiable. Como se usa en el presente documento, los términos "cyno" o "cynomolgus" se refieren al mono cynomolgus (Macaca fascicularis).

Como se utiliza en la presente, el término “tratar”, o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno (ej., trastorno asociado con LOX-1) se refiere en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, retardar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización “tratar” o “tratamiento” se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico incluyendo aquellos los cuales pueden ser no discernibles por el paciente. En aún otra

realización, “tratar” o “tratamiento” se refiere a modular la enfermedad o trastorno, bien sea físicamente, (*ej.*, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (*ej.*, estabilización de un parámetro físico), o ambos. En aún otra realización, “tratar” o “tratamiento” se refiere a prevenir o retardar el comienzo o desarrollo o progresión de la enfermedad o trastorno.

"Prevención" se refiere a las indicaciones descritas en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, trastorno asociado a LOX-1 , significa cualquier acción que previene o retarda un empeoramiento en, por ejemplo, parámetros de enfermedad asociados con LOX-1, como se describe a continuación, en un paciente en riesgo de dicho empeoramiento.

El término "vector" pretende referirse a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido al que se ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar. Otro tipo de vector es un vector viral, tal como un vector viral adeno-asociado (AAV, o AAV2), en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores mamíferos no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula hospedera, y de ese modo se replican junto con el genoma hospedero. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en la presente "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que sirven para funciones equivalentes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1A-1C representan la inhibición de la unión de OxLDL a la proteína LOX-1 por los anticuerpos LOX-1 de la invención. La figura 1A muestra OxLDL de alta unión, la Figura 1B muestra malondialdehído-LDL, y la Figura 1C muestra LDL modificada por hipoclorito, todo como se describe en el presente documento.

La Figura 2 representa anticuerpos LOX-1 que inhiben la unión de OxLDL Dil-rotulada a células HEK293 transfectadas de LOX-1 humano.

La Figura 3 representa una curva de respuesta a la dosis de inhibición de anticuerpos LOX-1 de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por oxLDL en células de HEK293 transfectadas de LOX-1 humano.

Las Figuras 4A-4F muestran anticuerpos LOX-1 (anticuerpos solos o en presencia de un Fab2 entrecruzante) que inhiben la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por oxLDL en células HEK293 transfectadas por LOX-1 humano. La figura 4A muestra el anticuerpo FF1, la figura 4B muestra el anticuerpo FF3, la Figura 4C muestra el anticuerpo FF4, la Figura 4D muestra el anticuerpo FF5, la Figura 4E muestra el anticuerpo FF6, y la figura 4F muestra hIgG1-LALA de control.

La Figura 5 representa anticuerpos LOX-1 que se unen a LOX-1 en la superficie de neutrófilos humanos.

Las figuras 6A-6B representan la determinación de la constante de disociación de anticuerpos (KD) mediante ensayos de valoración de equilibrio con solución (SET) con proteínas APP-Avi-LOX-1 humanas o de mono cynomolgus. La Figura 6A representa los datos para LOX-1 humana, y la Figura 6B representa los datos para LOX-1 de mono cynomolgus.

DESCRIPCION DETALLADA

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de moléculas de anticuerpos que se unen específicamente a LOX-1 e inhiben sus actividades biológicas. La invención se refiere tanto a los anticuerpos de de formato IgG completo, así como a fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tales como fragmentos Fab (por ejemplo, anticuerpos E2E10, FF1, FF3, FF4, FF5, FF6).

Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a LOX-1 (por ejemplo, LOX-1 humana, LOX-1 de cynomolgus), composiciones farmacéuticas, métodos de producción, y métodos de uso de tales anticuerpos y composiciones.

Proteínas LOX-1

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a LOX-1 e inhiben sus actividades biológicas, incluyendo sus actividades pro-oxidantes y pro-inflamatorias. LOX-1, un receptor para las LDL modificadas por oxidación (oxLDLs), se expresa en la superficie de las células vasculares (células endoteliales y células de músculo liso), neutrófilos, monocitos y macrófagos, y plaquetas. Además, LOX-1 está regulada positivamente en enfermedades vasculares, incluyendo en lesiones ateroscleróticas humanas y animales (Kataoka H, et al, Circulation 99;3110-3117). LOX-1 también está regulada positivamente en las enfermedades sistémicas autoinmunes / inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide, uveítis, degeneración macular relacionada con la edad, y pre-eclampsia). OxLDLs están implicados en la patogénesis de la enfermedad vascular. Además de oxLDLs, LOX-1 se une otros ligandos, incluyendo LDL acetilado, productos finales de glicación avanzada (AGE), proteína de choque térmico 70, (HSP70), células apoptóticas, eritrocitos madurados, plaquetas activadas, bacterias, fosfatidilserina, y proteína C reactiva (CRP).

LOX-1 es una proteína de membrana tipo II, que pertenece a la familia de lectina tipo C. LOX-1 también se clasifica como un receptor no definido clase E. LOX-1 consta de 4 dominios: un dominio citoplasmático N-terminal corto, una región transmembrana, un cuello de conexión, y un dominio similar a la lectina en el extremo C-terminal. El dominio tipo lectina C-terminal (CTLD; también se conoce como el dominio de unión a LDL-ox) es el dominio de unión a ligando (Sawamura T, y otros, Nature 386;. 73-77;. Shi

X, et al, J Cell Sci. . 114; 1273-1282). LOX-1 humano tiene la secuencia tal como se establece en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1), y se ha descrito en informes y publicaciones anteriores (Nature, Vol. 386, p 73-77, 1997; Genomics, Vol. 54, No 2, p 191-199, 1998;. Biochem. J., Vol. 339, Part 1, P. 177-184, 1999; Numero de Acceso Genbank. NP 002534).

La vía LDLox / LOX-1 contribuye al estrés oxidativo, inflamación vascular, aterosclerosis, y flujo sanguíneo tisular deteriorado y liberación de oxígeno. La activación de LOX-1 mediante la unión de ligandos de LOX-1 (por ejemplo, oxLDLs) resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno debido a la activación de la NADPH oxidasa, y la posterior activación de NFkB y las vías de la MAP quinasa resultando en inflamación. La vía de señalización oxLDL/LOX-1 actúa como un bucle de retroalimentación positiva, ya que la especie reactiva de oxigeno resulta en la formación de LDL-ox adicional y regula positivamente la expresión de LOX-1. La unión de oxLDLs a LOX-1 expresada en la superficie de los macrófagos también se traduce en la recaptación de oxLDL que contribuye a la formación de células espumosas y aterosclerosis. De manera importante, se piensa que la inflamación vascular es crítica para la patobiología de complicaciones trombóticas agudas de aterosclerosis, incluyendo infarto de miocardio y accidente cerebrovascular isquémico. Se ha mostrado que la activación de LOX-1 altera la función vasomotora al alterar la vasodilatación por un mecanismo que implica la NADPH oxidasa. Se ha mostrado que el deterioro de la vasodilatación se produce en pacientes con enfermedad arterial coronaria crónica y angina de pecho, y en pacientes con enfermedad arterial periférica y claudicación. Los estudios con ratones knockout LOX-1 y anticuerpos antagonistas LOX-1 han demostrado que la inhibición de LOX-1 puede tener efectos cardiovasculares beneficiosos. Por ejemplo, la anulación de LOX-1 previene el deterioro mediado -LDLox de vasodilatación y reduce la aterosclerosis (Mehta et al, Circulation Research 2007, 100: 1634). Además, se ha mostrado que los anticuerpos anti-LOX-1 (i) bloquean el estrés oxidativo inducido LDLox en las células endoteliales humanas (Ou, J Appl Phys. 2010, 108:1745.); y (ii) inhiben la producción de superóxido y restauran la expresión de eNOS, lo que mejora la biodisponibilidad de NO y la vasodilatación (Xu, Arteriosclerosis, Trombosis y Biología Vascular 2007, 27:871-877).

Se propone que la inhibición de LOX-1, por ejemplo a través de la administración de los anticuerpos anti-LOX-1 de la invención, mejorará el flujo sanguíneo y el

suministro de oxígeno al tejido isquémico, lo que resulta en un beneficio terapéutico a los pacientes con enfermedad vascular crónica, incluyendo angina de pecho, claudicación e isquemia crítica de las extremidades. La inhibición de LOX-1, por ejemplo a través de la administración de anticuerpos anti-LOX-1 de la invención, puede también retrasar o revertir la progresión de la aterosclerosis y reducir la incidencia de sus complicaciones trombóticas agudas (por ejemplo, síndrome coronario agudo, angina inestable, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular isquémico).

Anticuerpos LOX-1 & Fragmentos de Unión al Antígeno

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a LOX-1. En algunas formas de realización, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a LOX-1 humano y de mono cynomolgus. Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos humanos monoclonales y los Fab, aislados como se describe en los Ejemplos.

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LOX-1 (por ejemplo, LOX-1 humano y de cynomolgus), en donde los anticuerpos comprenden un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, o 94. La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LOX-1, en donde los anticuerpos comprenden una CDR VH que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR VH listadas en la Tabla 1, más adelante. En particular, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LOX-1 (ej., LOX-1 humano o cinomólogo), en donde los anticuerpos comprenden (o alternativamente, constan de) uno, dos, tres o más CDRs VH que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDRs VH listadas en la Tabla 1 más adelante.

La presente invención proporciona anticuerpos que especificamente se fijan a una proteína LOX-1, dichos anticuerpos que comprenden un dominio VL que tiene una secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 24, 44, 64, 84, o 104. La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LOX-1 (LOX-1 humano y de cynmolgus) dichos anticuerpos que comprenden una CDR VL que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDRs VL listadas en la Tabla 2,

más adelante. En particular, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LOX-1 (ej., LOX-1 humano o cinomólogo), en donde los anticuerpos comprenden (o alternativamente, constan de) uno, dos, tres o más CDRs VL que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDRs VL listadas en la Tabla 1 más adelante.

Otros anticuerpos de la invención incluyen aminoácidos que han sido mutados, pero tienen al menos 60%, 70%, 80%, 90%, o 95% de identidad en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en las secuencias descritas en la Tabla 2. En algunas realizaciones, ésta incluye secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han mutado en las regiones CDR, en comparación con las regiones CDR representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1.

La presente invención también proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican VH, VL, la cadena pesada de longitud completa, y la cadena ligera de longitud completa de los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína LOX-1 (por ejemplo, LOX-1 humano y cinomólogo). Tales secuencias de ácido nucleico pueden optimizarse para expresión en células mamíferas (por ejemplo, la Tabla 1 muestra las secuencias optimizadas de ácidos nucleicos para la cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos de la invención).

Tabla 1. Ejemplos de Anticuerpos LOX-1, Fabs y Proteínas LOX-1

Descripción de Secuencia	Identificador de Secuencia (SEQ ID NO:)	Secuencia de aminoácidos o polinucleotidos
Secuencia de proteínas de longitud completa de LOX-1 humano(Secuencia de Referencia NCBI: NM_002543.3)	1	MTFDDLKIQTVKDQPDEKSNGKKAKGLQFLYSPWWCLAA ATLGVLCLGLVVTIMVLGMQLSQVSDLLTQEQANLTHQKK KLEGQISARQQAEEASQESENELKEMIETLARKLNEKSKEQ MELHHQNLNLQETLKRVANCSAPCPQDWIWHGENCYLFSS GSFNWEKSQEKCLSLDAKLLKINSTADLDFIQQAISYSSFPF WMGLSRRNPSYPWLWEDGSPLMPHLFRVRGAVSQTYPSGT CAYIQRGAVYAENCILAAFSICQKKANLRAQ
Secuencia de Nucleotidos de Longitud Completa de LOX-1 humano(Secuencia de Referencia	2	ATGACTTTTGATGACCTAAAGATCCAGACTGTGAAGGAC CAGCCTGATGAGAAGTCAAATGGAAAAAAAGCTAAAGG TCTTCAGTTTCTTTACTCTCCATGGTGGTGCCTGGCTGCTG CGACTCTAGGGGTCCTTTGCCTGGGATTAGTAGTGACCAT TATGGTGCTGGGCATGCAATTATCCCAGGTGTCTGACCTC CTAACACAAGAGCAAGCAAACCTAACTCACCAGAAAAA

NCBI: NM_002543.3)		GAAACTGGAGGGACAGATCTCAGCCCGGCAACAAGCAG AAGAAGCTTCACAGGAGTCAGAAAACGAACTCAAGGAA ATGATAGAAACCCTTGCTCGGAAGCTGAATGAGAAATCC AAAGAGCAAATGGAACTTCACCACCAGAATCTGAATCTC CAAGAAACACTGAAGAGAGTAGCAAATTGTTCAGCTCCT TGTCCGCAAGACTGGATCTGGCATGGAGAAAACTGTTAC CTATTTTCCTCGGGCTCATTTAACTGGGAAAAGAGCCAA GAGAAGTGCTTGTCTTTGGATGCCAAGTTGCTGAAAATT AATAGCACAGCTGATCTGGACTTCATCCAGCAAGCAATT TCCTATTCCAGTTTTCCATTCTGGATGGGGCTGTCTCGGA GGAACCCCAGCTACCCATGGCTCTGGGAGGACGGTTCTC CTTTGATGCCCCACTTATTTAGAGTCCGAGGCGCTGTCTC CCAGACATACCCTTCAGGTACCTGTGCATATATACAACG AGGAGCTGTTTATGCGGAAAACTGCATTTTAGCTGCCTTC AGTATATGTCAGAAGAAGGCAAACCTAAGAGCACAG
Secuencia de aminoácidos de APP-Avi maduro - LOX-1 soluble humano (61-273) (etiquetas APP y Avi subrayadas)	6	EFRHGLNDIFEAQKIEWHESQVSDLLTQEQANLTHQKKKLE GQISARQQAEEASQESENELKEMIETLARKLNEKSKEQMEL HHQNLNLQETLKRVANCSAPCPQDWIWHGENCYLFSSGSF NWEKSQEKCLSLDAKLLKINSTADLDFIQQAISYSSFPFWM GLSRRNPSYPWLWEDGSPLMPHLFRVRGAVSQTYPSGTCA YIQRGAVYAENCILAAFSICQKKANLRAQ
Secuencia de nucleotidos de APP-Avi-LOX-1 soluble humano LOX-1(61-273) (Plasnova# NPL014428)	7	ATGCCCCTGCTGCTGCTCCTCCCCCTGCTGTGGGCTGGCG CCCTGGCCGAGTTCCGGCACGGCCTGAACGACATCTTCG AGGCCCAGAAAATCGAGTGGCACGAGAGCCAGGTGTCC GATCTGCTGACCCAGGAACAGGCCAACCTGACCCACCAG AAGAAGAAGCTGGAAGGCCAGATCAGCGCCAGACAGCA GGCCGAGGAAGCCAGCCAGGAAAGCGAGAACGAGCTGA AAGAGATGATCGAGACACTGGCCCGGAAGCTGAACGAG AAGTCCAAAGAACAGATGGAACTGCACCACCAGAACCTG AATCTGCAGGAAACCCTGAAGCGGGTCGCCAACTGCAGC GCCCCCTGCCCCCAGGACTGGATCTGGCACGGCGAGAAC TGCTACCTGTTCAGCAGCGGCAGCTTCAACTGGGAGAAG TCCCAGGAAAAGTGCCTGAGCCTGGACGCCAAGCTGCTG AAGATCAACAGCACCGCCGACCTGGACTTCATCCAGCAG GCCATCAGCTACAGCAGCTTCCCTTTCTGGATGGGCCTGA GCCGGCGGAACCCCAGCTACCCTTGGCTCTGGGAGGACG GCAGCCCCCTGATGCCCCACCTGTTCAGAGTGCGGGGAG CTGTGAGCCAGACCTACCCCAGCGGCACCTGTGCCTACA TCCAGCGCGGAGCCGTGTACGCCGAGAACTGCATCCTGG CCGCCTTCAGCATCTGCCAGAAGAAGGCCAATCTGCGGG CCCAGTAATAA
FF1		
HCDR1 (Kabat)	8	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	9	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	10	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	11	GYTFTDY

HCDR2 (Chothia)	12	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	13	WLPMDY
VH	14	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSTSTA YMELSSLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSS
VH que codifica ADN	15	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctctacctccaccgcctacatggaactgtc ctccctgcggagcgacgacaccgccgtgtactactgtgcccggtggctgcccatggactattg ggccagggcaccctcgtgaccgtgtcctct
Cadena Pesada	16	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSTSTA YMELSSLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ADN que codifica Cadena Pesada	17	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctctacctccaccgcctacatggaactgtc ctccctgcggagcgacgacaccgccgtgtactactgtgcccggtggctgcccatggactattg ggccagggcaccctcgtgaccgtgtcctctgcttctaccaagggcccttccgtgttccctctgg ccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtgaaggactactt ccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgaccagcggagtgcacaccttccct gccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtggtgacagtgccttcctccagcct gggcacacagacctacatctgcaacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaagc gggtggagcctaagtcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagccg

		ctggcggcccttctgtgtttctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggacc cctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaagtgaagttcaattggt acgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgggaggaacagtacaactc cacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagaat acaagtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaaggcca agggccagcctagggaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgaccaa gaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccttccgatatcgccgtggagtgg gagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctggactccgacgg ctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttct cctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgtctcc cggcaag
LCDR1 (Kabat)	18	RASQGINNWLV
LCDR2 (Kabat)	19	AASSLQS
LCDR3 (Kabat)	20	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	21	SQGINNW
LCDR2 (Chothia)	22	AAS
LCDR3 (Chothia)	23	YLITPY
VL	24	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
ADN que codifica VL	25	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaagctgctgatctacgctgcctccagtctgcagtccggcgtgccctctagattctccg gctctggctctggcgccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcgcca cctactactgccagcagtacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaa tcaag
Cadena Ligera	26	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
Cadena Ligera de	27	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca

ADN		cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaagctgctgatctacgctgcctccagtctgcagtccggcgtgccctctagattctccg gctctggctctggcgccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcgcca cctactactgccagcagtacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaa tcaagcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcagctgaaga gcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggccaaggtgcag tggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggac agcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgaga agcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagag cttcaacaggggcgagtgc
FF3		
HCDR1 (Kabat)	28	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	29	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	30	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	31	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	32	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	33	WLPMDY
VH	34	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSS
VH de ADN	35	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactg gggccagggcacactcgtgaccgtgtcctct
Cadena Pesada	36	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH

		NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Cadena Pesada de ADN	37	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactg gggccagggcacactcgtgaccgtgtcctctgcttccaccaagggcccttccgtgttccctctg gcccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtgaaggactac ttccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgaccagcggagtgcacaccttcc ctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtggtgacagtgccttcctccagc ctgggcacacagacctacatctgcaacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaa gcgggtggagcctaagtcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagc cgctggcggcccttctgtgtttctgttcccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga cccctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaagtgaagttcaattg gtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgggaggaacagtacaa ctccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaag aatacaagtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaagg ccaagggccagcctagggaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgac caagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccttccgatatcgccgtggagt gggagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctggactccgac ggctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgt tctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgtct cccggcaag
LCDR1 (Kabat)	38	RASQGINNWLV
LCDR2 (Kabat)	39	AASSLQS
LCDR3 (Kabat)	40	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	41	SQGINNW
LCDR2 (Chothia)	42	AAS
LCDR3 (Chothia)	43	YLITPY
VL	44	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG

		KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
VL de ADN	45	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaagctgctgatctacgctgcctccagtctgcagtccggcgtgccctctagattctccg gctctggctctggcgccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcgcca cctactactgccagcagtacctgatcacccccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaa tcaag
Cadena Ligera	46	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
Cadena Ligera de ADN	47	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaagctgctgatctacgctgcctccagtctgcagtccggcgtgccctctagattctccg gctctggctctggcgccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcgcca cctactactgccagcagtacctgatcacccccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaa tcaagcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcagctgaaga gcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggccaaggtgcag tggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggac agcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgaga agcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagag cttcaacaggggcgagtgc
FF4		
HCDR1 (Kabat)	48	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	49	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	50	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	51	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	52	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	53	WLPMDY
VH	54	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ

		APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSS
VH de ADN	55	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactg gggccagggcacactcgtgaccgtgtcctct
Cadena Pesada	56	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Cadena Pesada de ADN	57	Caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactg gggccagggcacactcgtgaccgtgtcctctgcttccaccaagggcccttccgtgttccctctg gcccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtgaaggactac ttccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgaccagcggagtgcacaccttcc ctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtggtgacagtgccttcctccagc ctgggcacacagacctacatctgcaacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaa gcgggtggagcctaagtcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagc cgctggcggcccttctgtgtttctgttcccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga cccctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaagtgaagttcaattg gtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgggaggaacagtacaa

		ctccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaag aatacaagtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaagg ccaagggccagcctagggaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgac caagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccttccgatatcgccgtggagt gggagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctggactccgac ggctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgt tctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgtct cccggcaag
LCDR1 (Kabat)	58	RASQGITNWLA
LCDR2 (Kabat)	59	AASILES
LCDR3 (Kabat)	60	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	61	SQGITNW
LCDR2 (Chothia)	62	AAS
LCDR3 (Chothia)	63	YLITPY
VL	64	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGITNWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASILESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIAT YYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
VL de ADN	65	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaccaactggctggcctggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaagctgctgatctacgccgcctccatcctggaatccggcgtgccctctagattctccg gctctggctctggcaccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccac ctactactgccagcagtacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaat caag
Cadena Ligera	66	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGITNWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASILESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIAT YYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
Cadena Ligera de ADN	67	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaccaactggctggcctggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaagctgctgatctacgccgcctccatcctggaatccggcgtgccctctagattctccg gctctggctctggcaccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccac

		ctactactgccagcagtacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaat caagcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatcttccccccaagcgacgagcagctgaaga gcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggccaaggtgcag tggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggac agcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgaga agcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagag cttcaacaggggcgagtgc
FF5		
HCDR1 (Kabat)	68	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	69	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	70	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	71	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	72	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	73	WLPMDY
VH	74	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSS
VH de ADN	75	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactg gggccagggcacactcgtgaccgtgtcctct
Cadena Pesada	76	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

		SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Cadena Pesada de ADN	77	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactg gggccagggcacactcgtgaccgtgtcctctgcttccaccaagggcccttccgtgttccctctg gcccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtgaaggactac ttccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgaccagcggagtgcacaccttcc ctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtggtgacagtgccttcctccagc ctgggcacacagacctacatctgcaacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaa gcgggtggagcctaagtcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagc cgctggcggcccttctgtgtttctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga cccctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaagtgaagttcaattg gtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgggaggaacagtacaa ctccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaag aatacaagtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaagg ccaagggccagcctagggaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgac caagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccttccgatatcgccgtggagt gggagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctggactccgac ggctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgt tctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgtct cccggcaag
LCDR1 (Kabat)	78	RASQGINNWLV
LCDR2 (Kabat)	79	AASRLES
LCDR3 (Kabat)	80	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	81	SQGINNW
LCDR2 (Chothia)	82	AAS
LCDR3 (Chothia)	83	YLITPY
VL	84	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG KAPKLLLYAASRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
VL de ADN	85	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca

		cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaaactgctgctgtacgccgcctccagactggaatctggcgtgccctccagattctccg gctctggctctggcaccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccac ctactactgccagcagtacctgatcacccccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaat caag
Cadena Ligera	86	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG KAPKLLLYAASRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
Cadena Ligera de ADN	87	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaaactgctgctgtacgccgcctccagactggaatctggcgtgccctccagattctccg gctctggctctggcaccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccac ctactactgccagcagtacctgatcacccccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaat caagcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcagctgaaga gcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggccaaggtgcag tggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggac agcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgaga agcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagag cttcaacaggggcgagtgc
FF6		
HCDR1 (Kabat)	88	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	89	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	90	WLPIDY
HCDR1 (Chothia)	91	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	92	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	93	WLPIDY
VH	94	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPIDYWGQGTLVTVSS
VH de ADN	95	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc

		ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatcgactactg ggccagggcacactcgtgaccgtgtcctct
Cadena Pesada	96	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQ APGQGLEWMGAIHPGSGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARWLPIDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Cadena Pesada de ADN	97	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtgaaggtgtc ctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgggtgcgacaggctccagg ccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggctctggcggcgctgcttacgtgcagaa attccagggcagagtgaccatgacccgggacacctccatctccaccgcctacatggaactgtc ccggctgagatccgacgacaccgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatcgactactg gggccagggcacactcgtgaccgtgtcctctgcttccaccaagggcccttccgtgttccctctg gccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtgaaggactac ttccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgaccagcggagtgcacaccttcc ctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtggtgacagtgccttcctccagc ctgggcacacagacctacatctgcaacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaa gcgggtggagcctaagtcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagc cgctggcggcccttctgtgtttctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga cccctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaagtgaagttcaattg gtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgggaggaacagtacaa ctccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaag aatacaagtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaagg ccaagggccagcctagggaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgac

		caagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccttccgatatcgccgtggagt gggagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctggactccgac ggctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgt tctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgtct cccggcaag
LCDR1 (Kabat)	98	RASQGINNWLV
LCDR2 (Kabat)	99	AASRLES
LCDR3 (Kabat)	100	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	101	SQGINNW
LCDR2 (Chothia)	102	AAS
LCDR3 (Chothia)	103	YLITPY
VL	104	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG KAPKLLLYAASRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
VL de AND	105	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaaactgctgctgtacgccgcctccagactggaatctggcgtgccctccagattctccg gctctggctctggcaccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccac ctactactgccagcagtacctgatcacccccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaat caag
Cadena Ligera	106	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPG KAPKLLLYAASRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIA TYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
Cadena Ligera de ADN	107	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacagagtgaccatca cctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtatcagcagaagcccggcaag gcccccaaactgctgctgtacgccgcctccagactggaatctggcgtgccctccagattctccg gctctggctctggcaccgactataccctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccac ctactactgccagcagtacctgatcacccccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaat caagcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcagctgaaga gcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggccaaggtgcag

		tggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagcgtcaccgagcaggac agcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaggccgactacgaga agcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagag cttcaacaggggcgagtgc
E2E10 (murino precursor)		
HCDR1 (Kabat)	108	DYEMH
HCDR2 (Kabat)	109	AIHPGSGGAAYIQKFKG
HCDR3 (Kabat)	110	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	111	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	112	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	113	WLPMDY
VH	114	QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFTDYEMHWVKQ TPVHGLEWIGAIHPGSGGAAYIQKFKGKATLTADKSSSTAH MELSSLTSEDSAVYYCTRWLPMDYWGQGTSVTVSS
DNA VH	115	caggtccagctgcagcagtcaggagccgaactggtgcggcccggagcttctgtcaaactgag ctgcaaggcactgggctacaccttcacagactatgagatgcactgggtgaaacagacccccgt ccatggactggaatggatcggagcaattcaccctggaagcggaggagcagcttacatccaga agtttaaagggaaggcaactctgaccgccgacaagagctcctctacagcccatatggagctga gttcactgactagcgaagatagcgccgtgtactattgtacccgctggctgcctatggactattgg ggacaggggacttcagtgacagtgagttca
LCDR1 (Kabat)	116	KASDHINNWLA
LCDR2 (Kabat)	117	GATSLET
LCDR3 (Kabat)	118	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	119	SDHINNW
LCDR2 (Chothia)	120	GAT
LCDR3 (Chothia)	121	YLITPY
VL	122	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPG NAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLSITGLQTEDVA TYYCQQYLITPYTFGGGTKLEIK
VL de ADN	123	gatattcagatgacccagagtagttcttacctgagcgtgtccctgggaggaagggtcaccatca

		catgcaaggcaagcgaccacattaacaattggctggcctggtaccagcagaaaccaggaaac gcacctcgactgctgatcagcggagctacttccctggagaccggcgtgccctctagattctctg gaagtggctcagggaaggactatacactgagcattactggcctgcagaccgaagatgtcgcta catactattgtcagcagtacctgattacaccctacactttcggcggcggaactaaactggagatta ag

Otros anticuerpos de la invención incluyen aquellos en donde los aminoácidos o ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos se han mutado, pero tienen al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con las secuencias descritas en la Tabla 1. En algunas realizaciones ncluyen secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han mutado en las regiones variables, en compración con las regiones variables representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1, mientras se conserva sustancialmente la misma actividad de unión al antígeno.

Como cada uno de estos anticuerpos pueden unirse a LOX-1, VH, VL, cadena ligera de longitud completa, y las secuencias de cadena pesada de longitud completa (las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos) pueden "mezclarse y combinarse" para crear otros anticuerpos de unión a LOX-1 de la invención. Tales anticuerpos de unión a LOX-1 "mezclados y combinados" pueden ser probados utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica (por ejemplo, ELISAs, y otros ensayos descritos en la sección de Ejemplos). Con estas cadenas mezcladas y correspondidas, una secuencia VH a partir de un pareo VH/VL particular debe ser reemplazada por una secuencia VH estructuralmente similar. Del mismo modo una secuencia de cadena pesada de longitud completa a partir de un pareo de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa particular debe ser reemplazada por una secuencia de cadena pesada de longitud completa de estructura similar. Del mismo modo, una secuencia VL a partir de un pareo VH/VL particular debe ser reemplazada por una secuencia VL estructuralmente similar. Del mismo modo una secuencia de cadena ligera de longitud completa desde un pareo particular de cadena pesada de longitud completa /cadena ligera de longitud completa debe ser reemplazada por una secuencia de cadena ligera de longitud completa estructuralmente similar.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o región de unión al antígeno del mismo que tiene: un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74, y 94 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, y 104, en donde el anticuerpo se une específicamente a LOX-1 (por ejemplo, LOX-1 humano y de mono cynomolgus).

Más específicamente, en ciertos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo aislado o región de unión a antígeno del mismo que tiene un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas de SEC ID No: 14 y 24; 34 y 44; 54 y 64; 74 y 84; o 94 y 104, respectivamente.

En otro aspecto, la invención proporciona (i) un anticuerpo aislado que tiene: una cadena pesada de longitud completa que ha sido optimizada para expresión en una célula mamífera seleccionada del grupo que consta de SEQ ID Nos: 16, 36, 56, 76 o 96, y una cadena ligera de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha optimizado para expresión en una célula mamífera seleccionada del grupo que consta de SEQ ID Nos: 26, 46, 66, 86, o 106; o (ii) una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno del mismo. Más específicamente, en ciertos aspectos, la invención proporciona un anticuerpo aislado o región de unión a antígeno del mismo que tiene una cadena pesada y una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos seleccionadas de SEC ID No: 14 y 24; 34 y 44; 54 y 64; 74 y 84; o 94 y 104, respectivamente.

Los términos “región determinante de complementariedad,” y “CDR”, como se utilizan en la presente se refieren a las secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables de anticuerpos que confieren especificidad de antígenos y afinidad de unión. En general, existen tres CDRs en cada región variable de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres CDRs en cada región variable de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

Los limites precisos de secuencias de aminoácidos de una CDR dada puede fácilmente determinarse utilizando cualquiera de un número de esquemas bien conocidos,

incluyendo aquellos descritos por Rabat. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración de "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (esquema de numeración "Chothia").

Por ejemplo, bajo Kabat, los residuos aminoácidos CDR del anticuerpo FF1 en el dominio variable de cadena pesada (VH) están enumerados 31-35 (HCDR1), 50-66 (HCDR2), y 99-104 (HCDR3); y los residuos aminoácidos CDR en el dominio variable de cadena ligera (VL) están enumerados 24-34 (CLDR1), 50-55 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3). Bajo Chothia los residuos aminoácidos CDR en la VH están enumerados 26-32 (HCDR1), 52-57 (HCDR2), y 99-104 (HCDR3); y los residuos aminoácidos en VL están enumerados 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2), y 91-96 (LCDR3). Al combinar las definiciones de CDR tanto de Kabat como de Chothia, las CDRs constan de residuos aminoácidos 26-35 (HCDR1), 50-66 (HCDR2), y 90-104 (HCDR3) en VH humano y residuos aminoácidos 24-34 (LCDR1), 50-55 (LCDR2), y 89-97 (LCDR3) en VL humano.

En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos de unión a LOX-1 que comprenden CDR1s, CDR2s y CDR3s de cadena pesada y cadena ligera como se describe en la Tabla 1, o combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1s VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, y 88. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s VH de los anticuerpos y se muestran en las SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, y 89. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 10, 30, 50, 70, y 90. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1s VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 18, 38, 58, 78, y 98. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, y 99. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80 y 100. Estas regiones CDR son delineadas utilizando el sistema de Kabat.

Alternativamente, como se define utilizando el sistema Chothia (Al-Lazikani, (1997) JMB 273,927-948), las secuencias de aminoácidos de las CDR1s VH de los anticuerpos se muestran en SEQ ID NOs: 11, 31, 51, 71, y 91. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s VH de los anticuerpos y se muestran en las SEQ ID NOs: 12, 32, 52, 72, y 92. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s VH de los anticuerpos se

muestran en las SEQ ID NOs: 13, 33, 53, 73, y 93. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1s VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 21, 41, 61, 81, y 101. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 22, 42, 62, 82, y 102. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 23, 43, 63, 83, y 103.

Dado que cada uno de estos anticuerpos pueden fijarse a LOX-1 y que la especificidad de unión al antígeno es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias VH CDR1, 2 y 3 y las secuencias VL CDR1, 2 and 3 pueden ser “mezcladas y combinadas” (es decir, CDRs de diferentes anticuerpos pueden combinarse y mezclarse, aunque cada anticuerpo preferiblemente contiene una VH CDR1, 2 y 3 y una VL CDR1, 2 and 3 para crear otras moléculas de unión a LOX-1 de la invención. Tales anticuerpos de unión a LOX-1 "mezclados y combinados" pueden ser probados utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica y aquellos descritos en los Ejemplos (por ejemplo, ELISAs, SET, Biacore). Cuando las secuencias CDR VH se combinan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia VH particular debe reemplazarse por una o varias secuencias CDR estructuralmente similares. Del mismo modo, cuando las secuencias CDR VL se combinan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia VL particular debe reemplazarse por una o varias secuencias CDR estructuralmente similares. Será evidente para el experto que las secuencias VH y VL novedosas pueden crearse al sustituir una o más secuencias de regiones CDR VH y/o VL por secuencias estructuralmente similares a partir de las secuencias CDR mostradas en la presente para anticuerpos monoclonales de la presente invención. Además de lo anteror, en una realización, los fragmentos de unión a antígenos de los anticuerpos descritos en la presente pueden comprender una VH CDR1, 2, y 3, o una VL CDR 1, 2, y 3, en donde el fragmento se une a LOX-1 como un único domino variable.

En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden tener las secuencias de cadena pesada y ligera de los Fabs descritos en la Tabla 1. Más específicamente, el anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno del mismo pueden tener la secuencia pesada y ligera de Fab FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6.

En otras realizaciones de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos que especificamente se une a LOX-1 comprende una región variable de cadena pesada CDR1, una región variable de cadena pesada CDR2, una región variable de cadena pesada CDR3, una región variable de cadena ligera CDR1, una región variable de cadena ligera CDR2, y una región variable de cadena ligera CDR3 como lo define Kabat y se describe en la Tabla 1. En aún otras realizaciones de la invención el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos al que específicamente se une LOX-1 comprende una región variable de cadena pesada CDR1, una región variable de cadena pesada CDR2, una región varaible de cadena pesada CDR3, una región variable de cadena ligera CDR1, una región variable de cadena ligera CDR2, y una región variable de cadena ligera CDR3 como lo define Chothia y se describe en la Tabla 1.

En una realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 8; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 9; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 10; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 18; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 19; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 20.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 28; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 29; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 30; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 38; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 39; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 40.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 48; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 49; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 50; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 58; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 59; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 60.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 68; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 69; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 70; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 78; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 79; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 80.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 88; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 89; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 90; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 98; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 99; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 100.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 11; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 12; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 13; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 21; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 22; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 23.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 31; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 32; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 33; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 41; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 42; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 43.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 51; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID

NO: 52; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 53; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 61; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 62; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 63.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 71; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 72; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 73; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 81; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 82; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 83.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que específicamente se une a LOX-1 que comprende una región variable de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 91; una región variable de cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 92; una región variable de cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 93; una región variable de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 101; una región variable de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO: 102; una región variable de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO: 103.

En ciertas realizaciones, la invención incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a LOX-1 como se describe en la Tabla 1. En una forma de realización preferida, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, que se une a LOX-1 es Fab FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6 .

Como se utiliza en la presente, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera o cadenas pesadas o ligeras de longitud completa que son "el producto de" o "se derivan a partir de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables o cadenas de longitud completa del anticuerpo se obtienen de un sistema que utiliza los genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen la inmunización de un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humanos con el antígeno de interés o la selección de una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana presentados en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva a partir de" una secuencia de

inmunoglobulina de línea germinal humana puede ser identificado como tal mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que está más cerca en secuencia (es decir, mayor % de identidad) con la secuencia del anticuerpo humano.

Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de origen natural o la introducción intencional de mutaciones sitio-dirigidas. Sin embargo, en las regiones variables VH o VL, un anticuerpo humano seleccionado normalmente es al menos 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal de ratón). En algunos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos 95%, o aún al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Típicamente, un anticuerpo humano recombinante mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos desde la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en las regiones variables VH o VL. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencias de aminoácidos desde la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Ejemplos de genes de inmunoglobulina de línea germinal incluyen, pero no se limitan a los fragmentos de línea germinal de dominio variable descritos más adelante, así como DP47 y DPK9.

Anticuerpos homólogos

En aún ora realización, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo que comprende secuencias de aminoácidos

que son homólogas a las secuencias descritas en la Tabla 1, y el anticuerpo se une a una proteína LOX-1 (por ejemplo, LOX-1 humano y cinomólogo), y retiene las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos descritos en la Tabla 1.

Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígenos funcional del mismo que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en donde el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de las SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74 o 94; el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 95%, 90%, o 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, o 104; y el anticuerpo se une específicamente a LOX-1 (por ejemplo, LOX-1 humano y de mono cynomolgus). En ciertos aspectos de la invención las secuencias de cadena pesada y ligera comprenden además secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tal como se define por Kabat, por ejemplo SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 18, 19, y 20, respectivamente. En ciertos aspectos de la invención las secuencias de cadena pesada y ligera comprenden además secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 tal como se define por Chothia, por ejemplo SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 21, 22, y 23, respectivamente.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos VH y/o VL pueden ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias expuestas en la Tabla 1. En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos VH y/o VL pueden ser idénticas excepto por una sustitución de aminoácidos en no más de 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos. Un anticuerpo que tiene regiones VH y VL que tiene alta identidad (es decir., 80% o más) con las regiones VH y VL de aquellas descritas en la Tabla 1 puede obtenerse mediante mutagénesis (*ej.*, dirigida a sitio o mutagenesis mutagenesis mediada por PCR) de móleculas de ácido nucleico que codifican SEQ ID NOs: 15, 35, 55, 75, o 95 y SEQ ID NOs: 25, 45, 65, 85 o 105 respectivamente, seguido de pruebas del anticuerpo alterado codificado para la función retenida utilizando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa y/o de cadena ligera de longitud completa pueden ser 50% 60%, 70%,

80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias divulgadas en la Tabla 1. Un anticuerpo que tiene una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa que tiene alta identidad (*es decir.*, 80% o más) con las cadenas pesadas de longitud completa de cualquiera de las SEQ ID NOs : 16, 36, 56, 76, o 96, y cadenas ligeras de longitud completa de cualquiera de las SEQ ID NOs: 26, 46, 66, 86, o 106, pueden obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos, seguido de la prueba del anticuerpo alterado codificado para la función retenida utilizando ensayos funcionales descritos en el presente documento.

En otras realizaciones, las secuencias nucleotídicas de cadena pesada de longitud completa y/o de cadena ligera de longitud completa pueden ser al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias divulgadas en la Tabla 1.

En otras realizaciones, las regiones variables de cadena pesada y/o las regiones variables de secuencias nucleotídicas de cadena ligera pueden ser al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias divulgadas en la Tabla 1.

Como se usa en la presente, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el % de identidad es igual al número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de brechas, y la longitud de cada brecha, que es necesario introducir para alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden realizarse utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes a continuación.

Adicional o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente invención se puede utilizar como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda contra las bases de datos públicos para, por ejemplo, identificar las secuencias relacionadas. Por ejemplo, tales búsquedas se pueden realizar utilizando el programa BLAST (versión 2,0) de Altschul. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10.

Anticuerpos con Modificaciones Conservadoras

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención tiene una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de CDR tienen secuencias de aminoácidos especificadas basadas en los anticuerpos descritos en la presente o modificaciones conservadoras de las mismas, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos de unión a LOX-1 de la invención.

Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígenos, que consta de una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, en donde: La región variable de cadena pesada de secuencias de aminoácidos CDR1 se seleccionan a partir del grupo que consta de las SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, y 88, y las modificaciones conservativas de la misma; la región variable de cadena pesada de las secuencias de aminoácidos de CDR2 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID No: 9, 29, 49, 69, y 89, y modificaciones conservativas de la misma; la región variable de cadena pesada de secuencias de aminoácidos CDR3 se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID No: 10, 30, 50, 70, y 90 y las modificaciones conservativas de la misma; las regiones variables de cadena ligera de secuencias de aminoácidos CDR1 se seleccionan a partir del grupo que consiste en SEQ ID N º: 18, 38, 58, 78, y 98, y las modificaciones conservativas de la misma; la región variable de cadena ligera de las secuencias de aminoácidos de CDR2 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID No: 19, 39, 59, 79, y 99, y modificaciones conservativas de la misma; las regiones variables de cadena ligera de secuencias de aminoácidos CDR3 se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID No: 20, 40, 60, 80, y 100, y las modificaciones conservativas de la misma, y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a LOX-1.

En otras realizaciones, el anticuerpo de la invención se optimiza para expresión en una célula mamífera tiene una secuencia de cadena pesada de longitud completa y una secuencia de cadena ligera de longitud completa, en donde una o más de estas secuencias tienen secuencia aminoácidos especificadas basadas en los anticuerpos descritos en la presente o modificaciones conservadoras de las mismas, y en donde los anticuerpso

retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos de unión a LOX-1 de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo aislado optimizado para expresión en una célula mamífera que consta de una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa en donde la cadena pesada de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo de SEQ ID NOs: 16, 36, 56, 76, 96 y las modificaciones conservativas de la misma, y la cadena ligera de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo de la SEQ ID No: 26, 46, 66, 86, o 106; y modificaciones conservadoras de las mismas; y el anticuerpo se une específicamente a LOX-1 (por ejemplo, LOX-1 humano y de mono cynomolgus).

Anticuerpos que se unen al mismo epítopo

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítopo que los anticuerpos de unión a LOX-1 descritos en la Tabla 1. Por lo tanto, anticuerpos adicionales pueden identificarse con base en su capacidad para competir (ej., para inhibir competitivamente la unión de, en una forma estadísticamente significativa) con otros anticuerpos de la invención en ensayos de unión a LOX-1 (tal como los descritos en los Ejemplos). La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de anticuerpos de la presente invención a una proteína LOX-1 demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo por la unión a FOX-1; tal anticuerpo puede, de acuerdo con la teoría no limitante, unirse al mismo epítopo o un epítopo relacionado (por ejemplo, estructuralmente similar o espacialmente próximo) con la proteína LOX-1 como el anticuerpo con el que compite. En una cierta realización, el anticuerpo que se une al mismo epítopo en LOX-1 como los anticuerpos de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse como se describe en la presente. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo "compite" por la unión cuando el anticuerpo competidor inhibe la unión a LOX-1 de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención en más de un 50% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) en presencia de una concentración equimolar de anticuerpo competidor.

En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención se unen al dominio tipo lectina del extremo C de LOX-1 (dominio de unión a LDL-ox), más específicamente a un epítopo que comprende los residuos aminoácidos 228 a 246 de LOX-1 humano (FRVRGAVSQTYPSGTCAYI; SEC ID No: 3). En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención se unen a un epítopo en LOX-1 humano que comprende los residuos de aminoácidos Arg229 y Arg231 de LOX-1 humano (SEC ID No: 1).

Anticuerpos diseñados y modificados

Un anticuerpo de la invención también se puede preparar usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias VH y/o VL mostradas en la presente como material de partida para diseñar un anticuerpo modificado, el cual puede tener propiedades modificadas con respecto al anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede diseñarse mediante la modificación de uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, VH y/o VL), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones variables. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse mediante la modificación de los residuos dentro de la(s) región(es) constante(s), por ejemplo para alterar la(s) función(es) efectora(s) del anticuerpo.

Un tipo de modificación de región variable que puede realizarse es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cadenas pesadas y ligeras. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDRs son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDRs. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos específicos de origen natural mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR a partir del anticuerpo específico de origen natural injertado en secuencias variables de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (ver, por ejemplo, Riechmann, (1998) Nature 332:323-327; Jones, (1986) Nature 321:522-525; Queen, (1989) Proc. Natl. Acad.,

EE.UU. 86:10029-10033; Patente de EE.UU. No 5.225.539 de Winter, y patentes de EE.UU. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 otorgadas Queen *et al.*)

En consecuencia, otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígenos del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEQ ID NO: 8, 28, 48, 68, y 88; secuencias CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 9, 29, 49, y 69, y 89; las secuencias CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 10, 30, 50,70, y 90 respectivamente, y una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 18, 38, 58, 78, y 98; secuencias CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 19, 39, 59,79, y 99; y las secuencias CDR3 que constan de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, y 100 respectivamente. Así, tales anticuerpos contienen las secuencias CDR VH y VL de anticuerpos monoclonales, pero pueden contener diferentes secuencias variables a partir de estos anticuerpos.

Tales secuencias variables pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para genes de región variable de cadena pesada y ligera humana pueden encontrarse en la base de datos de secuencias de línea germinal humana "VBase" (disponible en el sitio web mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, E. A., *et al.*, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Publicación NIH No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.*, 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox, J. P. L. *et al.*, 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836; los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan expresamente en la presente como referencia.

Un ejemplo de secuencias variables para su uso en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias variables utilizadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, secuencias de consenso y/o secuencias variables utilizadas por los anticuerpos monoclonales de la invención. Las secuencias de CDR1, 2 y 3 VH, y las secuencias de CDR1, 2 y 3 VL, pueden injertarse en

regiones variables que tienen la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de inmunoglobulina de línea germinal de donde se deriva la secuencia variable, o las secuencias de CDR pueden injertarse en regiones variables que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos, es beneficioso mutar los residuos dentro de las regiones variables para mantener o mejorar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (véase, por ejemplo, Patentes de EE.UU. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen). 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 otorgadas a Queen). Estructuras que pueden utilizarse como andamiajes sobre las cuales se construyen los anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a VH1A, VH1B, VH3, Vk1, Vl2, y Vk2 Estructuras adicionales se conocen en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo en la base de datos VBase en la pagina web at vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?&MMN_position=1:1.

En consecuencia, otra realización de la invención se refiere a anticuerpos aislados de unión a LOX-1, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEQ ID NO: 14, 34, 54,74, o 94 o una secuencia de aminoácidos que tienen una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones, o adiciones de aminoácidos en la región variable de tales secuencias, y que comprende además una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, 104, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en la región marco de tales secuencias.

Otro tipo de modificación de región variable es mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VH y/o VL para mejorar con ello una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés, conocidas como "maduración de afinidad". Mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR se puede realizar para introducir la(s) mutación(es) y el efecto sobre la unión de anticuerpos, u otra propiedad funcional de interés, pueden evaluarse en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en la presente y se proporciona en los Ejemplos. Modificaciones conservativas (como se discutió anteriormente) se pueden introducir. Las mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos, adiciones o supresiones. Además,

típicamente no más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR se alteran.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona anticuerpos aislados de unión a LOX-1, o fragmentos de unión a antígenos de los mimos, que constan de una región variable de cadena pesada que tiene una región CDR1 VH que consta de una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que tiene SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, y 88 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEC ID No: 8, 28, 48, 68;, y 88; una región CDR2 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, y 89 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEC ID No: 9, 29, 49, 69, y 89; una región CDR3 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 10, 30, 50, 70 y 90, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 10, 30, 50,70, y 90; una región CDR1 VL que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID NO: 18, 38, 58, 78 y 98, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 18, 38, 58,78, y 98; una región CDR2 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID NO: 19, 39, 59, 79 y 99, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 19, 39, 59,79, y 99; una región CDR3 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID NO: 20, 40, 60, 80 y 100, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 20, 40, 60, 80, y 100.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona anticuerpos aislados de unión a LOX-1, o fragmentos de unión a antígenos de los mimos, que constan de una región variable de cadena pesada que tiene una región CDR1 VH que consta de una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que tiene SEQ ID NOs: 11, 31, 51, 71, y 91 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEC ID No:

11, 31, 51, 71;, y 91; una región CDR2 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 12, 32, 52, 72, y 92 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEC ID No: 12, 32, 52, 72, y 92; una región CDR3 VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 13, 33, 53, 73 y 93, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 13, 33, 53,73, y 93; una región CDR1 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID NO: 21, 41, 61, 81 y 101, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 21, 41, 61, 81, y 101; una región CDR2 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID NO: 22, 42, 62, 82 y 102, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 22, 42, 62,82, y 102; y una región CDR3 VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID NO: 23, 43, 63, 83 y 103, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID No: 23, 43, 63, 83, y 103.

Injerto de Dominios de Unión al Antígeno en los Marcos o Andamios Alternativos

Una amplia variedad de estructuras o andamiajes de anticuerpos/inmunoglobulina pueden emplearse siempre y cuando el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que específicamente se una a LOX-1. Tales estructuras o andamiajes incluyen los 5 idiotipos principales de inmunoglobulinas humanas, o fragmentos de los mismos, e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, preferiblemente que tienen aspectos humanizados. Anticuerpos únicos de cadena pesada tales como los identificados en los camélidos son de interés particular en este aspecto. Nuevas estructuras, andamiajes y fragmentos siguen descubriéndose y desarrollándose por los expertos en la técnica.

En un aspecto, la invención se refiere a la generación de anticuerpos no basados en inmunoglobulinas utilizando andamios no inmunoglobulinos en los que las CDRs de la invención pueden injertarse. Estructuras y andamiajes no inmunoglobulinos conocidos o futuros se pueden emplear, siempre que comprendan una región de unión específica para la proteína LOX-1 diana. Marcos o andamios no inmunoglobulinos conocidos incluyen, pero no están limitados a, fibronectina (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd., Cambridge, MA y Ablynx nv, Zwijnaarde, Bélgica), lipocalina (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), inmuno-farmacéuticos modulares pequeños (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc., Mountain View, CA), Proteína A (Affibody AG, Suecia), y afilina (gamma-cristalina o ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

Los andamiajes de fibronectina se basan en el dominio tipo III de fibronectina (por ejemplo, el décimo módulo de fibronectina tipo III (dominio 10 Fn3)). El dominio de fibronectina tipo III tiene 7 u 8 hebras beta las cuales están distribuidas entre dos láminas beta, que se empaquetan entre sí para formar el núcleo de la proteína, y otras que contienen bucles (análogos a CDRs) que conectan las hebras beta entre sí y están expuestos a solventes. Existen por lo menos tres bucles de este tipo en cada borde del sándwich de lámina beta, donde el borde es la frontera de la proteína perpendicular a la dirección de las hebras beta (véase EE.UU. 6.818.418). Estos andamios basados en fibronectina no son una inmunoglobulina, aunque el pliegue global está estrechamente relacionado con el del fragmento de anticuerpo funcional más pequeño, la región variable de la cadena pesada, que comprende la unidad de reconocimiento del antígeno completo en IgG de camello y llama. Debido a esta estructura, el anticuerpo no inmunoglobulina imita las propiedades de unión a antígeno que son similares en naturaleza y afinidad a las de los anticuerpos. Estos andamios se pueden utilizar en una aleatorización de bucle y estrategia de barajado in vitro que es similar al proceso de maduración de afinidad de anticuerpos in vivo. Estas moléculas basadas en fibronectina pueden usarse como andamios en donde las regiones del bucle de la molécula pueden ser reemplazadas con CDRs de la invención usando técnicas de clonación estándar.

La tecnología anquirina se basa en el uso de proteínas con módulos de de repetición derivados de anquirina como andamios para soportar regiones variables que se pueden utilizar para la unión a diferentes dianas. El módulo de repetición de anquirina es

un polipéptido de 33 aminoácidos que consta de dos α-propelentes anti-paralelos y un β-giro. La unión de las regiones variables está optimizada principalmente mediante el uso de representación de ribosomas.

Los avímeros se derivan a partir de proteína que contiene dominio A tales como LRP-1. Estos dominios se utilizan por naturaleza para las interacciones proteína-proteína y en humanos en más de 250 proteínas se basan estructuralmente en dominios A. Los avimeros constan de un número de diferentes monomeros de "dominio-A" (2-10) ligados a través de enlazadores de aminoácidos. Pueden crearse avimeros que pueden unirse al antígeno diana utilizando la metodología descrita en, por ejemplo, la solicitud de EE.UU. Publicación de Patente Nos. 20040175756; 20050053973; 20050048512 y 20060008844.

Los ligandos de afinidad de aficuerpos son pequeñas proteínas simples compuestas de un conjunto de tres propelentes basado en el andamio de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A. La proteína A es una proteína de superficie de la bacteria Staphylococcus aureus. Este dominio andamio consta de 58 aminoácidos, 13 de los cuales son asignados al azar para generar bibliotecas de aficuerpo con un gran número de variantes de ligandos (Véase, por ejemplo, EE.UU. 5.831.012). Las moléculas de aficuerpo imitan anticuerpos, tienen un peso molecular de 6 kDa, en comparación con el peso molecular de los anticuerpos, que es de 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de unión de moléculas de aficuerpo es similar a la de un anticuerpo.

Las anticalinas son productos desarrollados por la empresa Pieris ProteoLab AG. Son derivados de lipocalinas, un amplio grupo de proteínas pequeñas y robustas que están normalmente implicadas en el transporte o el almacenamiento fisiológico de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Varias lipocalinas naturales ocurren en los tejidos humanos o líquidos corporales. La arquitectura de la proteína es una reminiscencia de inmunoglobulinas, con bucles hipervariables en la parte superior de un marco rígido. Sin embargo, en contraste con los anticuerpos o sus fragmentos recombinantes, las lipocalinas se componen de una única cadena polipeptídica con 160 a 180 residuos de aminoácidos, siendo sólo ligeramente más grande que un único dominio de inmunoglobulina. El conjunto de cuatro bucles, que constituye el bolsillo de unión, muestra la plasticidad estructural pronunciada y tolera una variedad de cadenas laterales. El sitio de unión puede así reconfigurarse en un proceso patentado con el fin de reconocer las moléculas diana prescritas de forma diferente con alta afinidad y especificidad. Una proteína de la familia

lipocalina, la proteína de unión a Bilin (BBP) de Pieris Brassicae ha sido utilizada para desarrollar anticalinas por mutagénesis de la serie de cuatro bucles. Un ejemplo de una solicitud de patente que describe anticalinas está en la publicación PCT No WO 199916873.

Las moléculas de afilina son pequeñas proteínas no inmunoglobulina que están diseñadas para afinidades específicas hacia las proteínas y moléculas pequeñas. Nuevas moléculas de afilina pueden seleccionarse muy rápidamente a partir de dos bibliotecas, cada una de los cuales está basada en una proteína de andamiaje derivada de ser humano diferente. Las moléculas de afilina no muestran ninguna homología estructural con proteínas de inmunoglobulina. En la actualidad, dos andamios de afilina se emplean, uno de los cuales es cristalino gamma, una proteína del cristalino estructural humano y el otro son las proteínas de la superfamilia "ubiquitina". Ambos andamios humanos son muy pequeños, muestran una estabilidad a alta temperatura y son casi resistentes a los cambios de pH y agentes desnaturalizantes. Esta alta estabilidad es principalmente debida a la estructura de lámina beta expandida de las proteínas. Ejemplos de proteínas derivadas de cristalinas gamma se describen en WO200104144 y ejemplos de proteínas tipo "ubiquitina "se describen en WO2004106368.

Miméticos de epítopo proteicos (PEM) son moléculas cíclicas tipo péptido de tamaño medio (MW 1-2 kDa) que imitan las estructuras beta-horquilla secundarias de las proteínas, la estructura secundaria importante implicada en interacciones proteína-proteína.

La presente invención proporciona anticuerpos completamente humanos que específicamente se unen a una proteína LOX-1. En comparación con los anticuerpos quiméricos o humanizados, los anticuerpos humanos de unión a LOX-1 de la invención tienen antigenicidad adicionalmente reducida cuando se administran a sujetos humanos.

Anticuerpos camélidos

Proteínas de los anticuerpos obtenidos de los miembros de la familia del camello y dromedario (Camelus bactrianus y Calelus dromaderius) incluyendo a los miembros del nuevo mundo, como especies de llama (Lama paccos, Lama glama y Lama Vicugna) se

han caracterizado con respecto al tamaño, complejidad estructural y antigenicidad para sujetos humanos. Ciertos anticuerpos IgG de esta familia de mamíferos que se encuentran en la naturaleza carecen de cadenas ligeras, y por tanto son estructuralmente distintos de la estructura cuaternario de cuatro cadenas típica que tiene dos cadenas ligeras y dos pesadas, para los anticuerpos de otros animales. Ver PCT/EP93/02214 (WO 94/04678 publicada el 3 de marzo de 1994).

Una región del anticuerpo de camélido que es el dominio variable único pequeño identificado como VHH se puede conseguir mediante ingeniería genética para producir una proteína pequeña que tiene alta afinidad para una diana, lo que resulta en una proteína derivada de anticuerpo de bajo peso molecular conocida como un "nanocuerpo camélido ". Veáse patente EE.UU. No. 5,759,808 presentada en Junio 2, 1998; veáse también Stijlemans, B., 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M. 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. *et al.* 2002 Int J Cancer 89: 456-62; Pleschberger, M. 1998 EMBO J 17: 3512-3520. Bibliotecas modificadas de anticuerpos camelidos y fragmentos de anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, en Ablynx, Ghent, Belgica. Al igual que con otros anticuerpos de origen no humano, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de camélido puede alterarse de manera recombinante para obtener una secuencia que se asemeja más a una secuencia humana, es decir, el nanocuerpo puede ser "humanizado". Así, la antigenicidad natural baja de anticuerpos de camélidos para los seres humanos puede reducirse aún más.

El nanocuerpo camélido tiene un peso molecular de aproximadamente una décima parte de una molécula de IgG humana, y la proteína tiene un diámetro físico de sólo unos pocos nanómetros. Una consecuencia del pequeño tamaño es la capacidad de nanocuerpos camélidos de unirse a sitios antigénicos que son funcionalmente invisibles para proteínas de anticuerpo más grandes, es decir, nanocuerpos camélidos son útiles como reactivos de detección de los antígenos que son de otra manera crípticos utilizando técnicas inmunológicas clásicas, y como posibles agentes terapéuticos . Así, otra consecuencia del pequeño tamaño es que un nanocuerpo camélido puede inhibir como resultado de la unión a un sitio específico en una ranura o estrecha hendidura de una proteína diana, y por lo tanto puede servir en una capacidad que se asemeja más a la función de un fármaco de bajo peso molecular clásico que la de un anticuerpo clásico.

El bajo peso molecular y tamaño compacto resultan además en que los nanocuerpos camélidos son extremadamente termoestables, estable al pH extremo y a la digestión proteolítica, y deficientemente antigénica. Otra consecuencia es que los nanocuerpos camélidos se mueven fácilmente desde el sistema circulatorio a los tejidos, e incluso cruzan la barrera sangre-cerebro y pueden tratar trastornos que afectan al tejido nervioso. Los nanocuerpos pueden facilitar adicionalmente el transporte del fármaco a través de la barrera hematoencefálica. Véase la solicitud de patente EE.UU. 20040161738 publicado 19 de agosto 2004. Estas características combinadas con la baja antigenicidad a los seres humanos indican un gran potencial terapéutico. Adicionalmente, estas moléculas pueden ser totalmente expresadas en células procariotas tales como E. coli y se expresan como proteínas de fusión con bacteriófagos y son funcionales.

Por consiguiente, una característica de la presente invención es un anticuerpo o nanocuerpo camélido que tiene alta afinidad con LOX-1. En ciertas realizaciones en la presente, el anticuerpo o nanocuerpo camélido es producido de manera natural en el animal camélido, es decir, se produce por el camelido después de inmunización con LOX-1 o un fragmento peptídico del mismo, utilizando técnicas descritas en la presente para otros anticuerpos. Alternativamente, el nanocuerpo camélido de unión a LOX-1 es modificado, es decir, producido por selección, por ejemplo, a partir de una biblioteca de fagos que presentan adecuadamente proteínas de nanocuerpos camélidos mutagenizados que utilizan procedimientos de paneo con LOX-1 como una diana como se describe en los ejemplos en la presente. Los nanocuerpos modificados además se pueden personalizar mediante ingeniería genética para tener una vida media en un sujeto receptor entre 45 minutos y dos semanas. En una realización específica, el anticuerpo o nanocuerpo camélido se obtiene al injertar las secuencias CDRs de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos humanos de la invención en el nanocuerpo o secuencia variables de anticuerpos de dominio sencillo, como se describe por ejemplo en PCT/EP93/02214.

Moléculas Biespecíficas y Anticuerpos Multivalentes

En otro aspecto, la presente invención incluye moléculas biespecíficas o multiespecíficas que comprenden un anticuerpo de unión a LOX-1, o un fragmento del mismo, de la invención. El anticuerpo de la invención, o regiones de unión a antígenos

del mismo pueden derivatizarse o ligarse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor), para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión diferentes o moléculas diana. El anticuerpo de la invención pueden en realidad ser derivatizado o ligado a más de una molécula funcional para generar moléculas multi-específicas que se unen a más de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas diana; tales moléculas multi-específicas también pretenden ser incluidas por el término "molécula biespecífica" como se utiliza en la presente. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede ligarse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de tal manera que se produzca una molécula biespecífica.

Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para LOX-1 y una segunda especificidad de unión por un segundo epítopo diana. Por ejemplo, el segundo epítopo diana es otro epítopo de LOX-1 diferente del primer epítopo diana.

Adicionalmente, para la invención en la cual la molécula biespecífica es multi-específica, la molécula puede además incluir una tercera especificidad de unión, además del primero y segundo epítopos diana.

En una realización, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo un Fab, Fab', F(ab')2, Fv, o una cadena Fv sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o de cadena pesada, o cualquier fragmento mínima del mismo tal como un Fv o un constructo de cadena sencilla como se describió en Ladner Patente EE.UU. No. 4,946,778.

Los diacuerpos son moléculas bivalentes, biespecíficas en las cuales los dominios VH y VL se expresan sobre una única cadena polipeptídica, conectada por un enlazador que es demasiado corto para permitir pareo entre los dos dominios en la misma cadena. Los dominios VH y VL se parean con dominios complementarios de otra cadena, creando así dos sitios de unión a antígenos (veáse e.j., Holliger *et al.*, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak *et al.*, 1994 Structure 2:1121-1123). Los diacuerpos se

pueden producir mediante la expresión de dos cadenas de polipéptidos, ya sea con la estructura de VHA-VLB y VHB-VLA (configuración VH-VL), o VLA-VHB y VHA VLB-(configuración VL-VH) dentro de la misma célula. La mayoría de éstos se puede expresar en forma soluble en bacterias. Diacuerpos de cadena única (scDb) se producen mediante la conexión de las dos cadenas de polipéptidos formadoras de diacuerpos con enlazador de aproximadamente 15 residuos de aminoácidos (véase Holliger y Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(3-4):128-30; Wu *et al.*, 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36). scDb puede expresarse en bacterias en forma soluble, activa, monomerica (veáse Holliger y Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(34): 128-30; Wu *et al.*, 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36; Pluckthun y Pack, 1997 Immunotechnology, 3(2): 83-105; Ridgway, 1996 Protein Eng., 9(7):617-21). Un diacuerpo puede fusionarse a Fc para generar un "di-diacuerpo" (veáse Lu *et al.*, 2004 J. Biol. Chem., 279(4):2856-65).

Otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas pueden prepararse al conjugar las especificidades de unión componentes, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse de manera separada y luego conjugarse entre sí. Cunado las especificidades de unión son proteínas o péptidos, una variedad de agentes de acoplamiento o entre-cruzamiento pueden utilizarse para conjugación covalente. Ejemplos de agentes entrecruzantes incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5 '-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (OPDM), N- succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4 - (N-maleimidometil) ciclohexano-l-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky, (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, (1985) ProcNatl AcadSci EE.UU. 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) BehringIns. Mitt. No. 78.118:118-132; Brennan, (1985) Science 229:81-83), y Glennie, (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375). Agentes conjugantes son SATA y sulfo SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, estos pueden ser conjugados mediante la unión de sulfhidrilo a las regiones bisagra del extremo C de las dos cadenas

pesadas. En una realización particular, la región de bisagra se modifica para contener un número impar de residuos de sulfhidrilo, por ejemplo, uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F (ab ')$_2$ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena única que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en la patente EE.UU. número 5.260.203; patente EE.UU. número 5.455.030; patente de EE.UU. número 4.881.175; patente de EE.UU. número 5.132.405; patente de EE.UU. número 5.091.513; Número de patente de EE.UU. 5.476.786; patente de EE.UU. número 5.013.653; patente de EE.UU. número 5.258.498; y patente de EE.UU. número 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse mediante, por ejemplo, ensayo immunosorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (REA), análisis FACS, ensayo biológico (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o ensayo de Western Blot. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos anticuerpo-proteína de interés particular empleando un reactivo etiquetado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

En otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos multivalentes que comprenden al menos dos porciones de unión a antígenos idénticas o diferentes de los anticuerpos de la invención uniéndose a LOX-1. Las porciones de unión a antígenos pueden enlazarse juntas a través de fusión proteica o enlace covalente o no covalente. Alternativamente, los métodos de enlace se han descrito para las moléculas biespecíficas. Compuestos tetravalentes se pueden obtener por ejemplo por anticuerpos entrecruzados de los anticuerpos de la invención con un anticuerpo que se une a las regiones constantes de los anticuerpos de la invención, por ejemplo la región Fc o de bisagra.

Los dominios de trimerización se describen por ejemplo en la patente EP 1012280B1 Boreal. Los módulos de pentamerizición se describen por ejemplo en PCT/EP97/05897.

Anticuerpos con Vida Media Extendida

La presente invención proporciona anticuerpos que específicamente se unen a la proteína LOX-1 que tienen una vida media extendida *in vivo.*

Muchos factores pueden afectar la vida media de una proteína *in vivo*. Por ejemplo, la filtración renal, metabolismo en el hígado, degradación por enzimas proteolíticos (proteasas), y respuestas inmunogénicas (por ejemplo, la neutralización protéica por anticuerpos y absorción por macrófagos y células dendríticas). Una variedad de estrategias pueden utilizarse para extender la vida media de los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, mediante enlace químico a polietilenglicol (PEG), reCODE PEG, andamio de anticuerpos, ácido polisiálico (PSA), almidón de hidroxietilo (HES), ligandos de unión a albúmina, y placas de carbohidrato; por fusión genética a proteínas de unión a proteínas séricas, tales como albúmina, IgG, FcRn, y transferir; por acoplamiento (de manera genética o química) a otras fracciones de unión que se unen a las proteínas séricas, tales como nanocuerpos, Fabs, DARPins, avimeros, aficuerpos y anticalinas; por fusión genética a RPEG, albúmina, dominio de albúmina, proteínas de unión a albúmina y Fc, o por la incorporación en nanovehiculos, formulaciones de liberación lenta, o dispositivos médicos.

Para prolongar la circulación sérica de anticuerpos *in vivo*, moléculas poliméricas inertes tales como PEG de alto peso molécular pueden ser fijadas a los anticuerpos con o sin un enlazador multifuncional ya sea a través de conjugación específica a sitio del PEG al extremo N o C de los anticuerpos o a través de grupos épsilon-amino presentes en los residuos de lisina. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo o fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilénglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se adhieren al anticuerpo o fragmento del mismo. La pegilación puede realizarse por una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Tal como se utiliza en la presente, el término "polietilenglicol" se pretende que abarque cualquiera de las formas de PEG que han sido

utilizadas para derivatizar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi- o ariloxi polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a ser pegilado es un anticuerpo aglicosilado. Se puede utilizar derivatización de polímero lineal o ramificado que resulta en una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación puede ser estrechamente monitoreado por SDS-PAGE y espectrometría de masas para garantizar la conjugación apropiada de moléculas PEG al anticuerpo. PEG sin reaccionar se puede separar de anticuerpo-conjugados PEG mediante exclusión por tamaño o mediante cromatografía de intercambio iónico. Los anticuerpos derivados de PEG pueden probarse para la actividad de unión, así como para la eficacia in vivo utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante los inmunoensayos descritos en la presente. Métodos para proteínas de pegilación se conocen en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invencion. Véase por ejemplo, el documento EP 0 154 316 por Nishimura, Y EP 0 401 384 por Ishikawa).

Otras tecnologías de pegilación modificadas incluyen tecnología de modificación dirigida ortogonal químicamente reconstructiva (ReCODE PEG), que incorpora cadenas laterales químicamente definidas en proteínas biosintéticas a través de un sistema reconstituido que incluye ARNt sintetasa y ARNt. Esta tecnología permite la incorporación de más de 30 nuevos aminoácidos en las proteínas biosintéticas en células de *E. coli*, de levadura y mamíferas. El tRNA incorpora un aminoácido no nativo en cualquier lugar que un codón ámbar esté posicionado, convirtiendo el ámbar de un codón de parada a uno que indica la incorporación del aminoácido químicamente definido.

La tecnología de pegilación recombinante (rPEG) también se puede utilizar para la extensión de vida media sérica. Esta tecnología consiste en la fusión genética de cola de proteína no estructurada de 300-600 aminoácidos a la proteína farmacéutica existente. Debido a que el peso molécular aparente de dicha cadena de proteína no estructurada es aproximadamente 15 veces mayor que su peso molécular real, la vida media en suero de la proteína será mucho mayor. En contraste a la PEGilación tradicional, que requiere la conjugación química y repurificación, el proceso de fabricación se simplifica enormemente y el producto es homogéneo.

La polisialización es otra tecnología, que utiliza el polímero natural PSA para prolongar la vida activa y mejorar la estabilidad de los péptidos y proteínas terapéuticas. PSA es un polímero de ácido siálico (un azúcar). Cuando se utiliza para la administración

de proteínas y medicamentos peptídicos terapéuticos, el ácido polisiálico proporciona un microambiente protector sobre la conjugación. Esto aumenta la vida activa de la proteína terapéutica en la circulación y evita que sea reconocido por el sistema inmune. El polímero PSA se encuentra naturalmente en el cuerpo humano. Fue adoptado por ciertas bacterias que evolucionaron durante millones de años para recubrir las paredes de la misma. Estas bacterias naturalmente polisialilazadas fueron capaces, en virtud de mimetismo molécular, de frustrar el sistema defensivo del cuerpo. PSA, la tecnología de sigilo óptima de la naturaleza, puede producirse fácilmente a partir de dichas bacterias en grandes cantidades y con determinadas características físicas. PSA bacteriano es completamente no inmunogénico, incluso cuando se acopla a proteínas, ya que es químicamente idéntico al PSA en el cuerpo humano.

Otra tecnología incluye el uso de derivados de almidón de hidroxietilo ("HES") vinculados a los anticuerpos. HES es un polímero natural modificado derivado de almidón de maíz ceroso y puede ser metabolizado por las enzimas del cuerpo. Soluciones de HES se administran normalmente para sustituir el volumen de sangre deficiente y para mejorar las propiedades reológicas de la sangre. La hesilación de un anticuerpo permite la prolongación de la vida media en circulación al aumentar la estabilidad de la molécula, así como mediante la reducción de la depuración renal, lo que resulta en una actividad biológica aumentada. Mediante la variación de diferentes parámetros, tales como el peso molecular de HES, una amplia gama de conjugados de anticuerpos HES se pueden personalizar.

Anticuerpos que tienen una vida media aumentada *in vivo* también pueden generarse introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o supresiones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn del mismo (preferiblemente un fragmento de dominio de Fc bisagra o fragmento de dominio Fc) . Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N º WO 98/23289; Publicación Internacional N º WO 97/34631, y la patente estadounidense N º 6.277.375.

Además, los anticuerpos pueden conjugarse a albúmina (ej., albúmina de suero humano; HSA) con el fin de que los anticuerpos sean más estables *in vivo* o tengan una vida media *in vivo* más prolongada. Las técnicas son bien conocidas en el estado de la técnica, véase por ejemplo Publicación Internacional Nos. WO 93/15199, WO 93/15200,

y WO 01/77137; y Patente Europea No. EP 413,622. Además, en el contexto de un anticuerpo biespecífico como se describió anteriormente, las especificidades del anticuerpo pueden ser diseñadas de manera que el dominio de unión del anticuerpo se une a LOX-1 mientras un segundo dominio de unión del anticuerpo se une a la albúmina de suero, preferiblemente HSA.

Las estrategías para aumentar la vida media son especialmente útiles en nanocuerpos, aglomerantes basados en fibronectina, y otros anticuerpos o proteínas para los cuales se desea vida media in vivo aumentada.

Conjugados de Anticuerpos

La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a una proteína LOX-1 fusionada de manera recombinante o conjugada químicamente (incluyendo tanto conjugaciones covalentes como no covalentes) a una proteína o polipéptido heterólogo (o un fragmento del mismo, preferiblemente a un polipéptido de al menos 10 , al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. En particular, la invención proporciona proteínas de fusión que comprenden un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo descritos en la presente (por ejemplo, un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F (ab) $_2$, un dominio VH, un CDR VH, un dominio VL o un CDR VL) y una proteína heteróloga, polipéptido o péptido. Los métodos para fusionar o conjugar proteínas, polipéptidos, o péptidos a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Patente estadounidense Nos. 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851, y 5,112,946; Patente Europea Nos. EP 307,434 y EP 367,166; Publicación Internacional Nos. WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng, 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; y Vil, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337- 11341.

Proteínas de fusión adicionales pueden generarse a través de las técnicas de transposiciones genéticas, transposiciones de motivos, transposiciones de exones, y/o transposiciones de codones (denominados de manera colectiva “transposiciones de ADN”). Las transposiciones de ADN pueden emplearse para alterar las actividades de los

anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos con afinidades mayores y tasas de disociación menores). Véase, en general, las patentes estadounidense Nos. 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252, y 5,837,458; Patten, 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33; Harayama, (1998) Trends Biotechnol. 16 (2) :76-82; Hansson, (1999) J. Mol. Biol. 287:265-76, y Lorenzo y Blasco, (1998) Biotechniques 24 (2): 308 - 313 (cada una de estas patentes y publicaciones se incorporan en la presente como referencia en su totalidad). Los anticuerpos o fragmentos de los mismos, o los anticuerpos codificados o fragmentos de los mismos, pueden ser alterados al ser sometidos a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a una proteína LOX-1 puede ser recombinado con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc de una o más moléculas heterólogas.

Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc, 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz , (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86:821-824, por ejemplo, hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina de la influenza (Wilson, (1984) Cell 37:767), y la etiqueta "bandera".

En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos conjugados con un agente de diagnóstico o detectable. Tales anticuerpos pueden ser útiles para monitorear o pronosticar el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad o trastorno como parte de un procedimiento de ensayo clínico, tal como la determinación de la eficacia de una terapia particular. Tal diagnóstico y detección se puede lograr mediante el acoplamiento de los anticuerpos a sustancias detectables incluyendo, pero no limitando a, enzimas diversas, tales como, pero no limitadas a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o

acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero no se limitan a, streptavidinlbiotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no limitado a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina- fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero no limitado a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero no limitados a, luciferina, luciferasa y aecuorina, materiales radiactivos, tales como, pero no limitado a, yodo (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, y ^{121}I ,), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^{3}H), indio (^{115}In, ^{113}In, ^{112}In, ^{111}In y,), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Ti), galio (^{68}Ga, ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm, ^{177}Lu, ^{159}Gd, ^{149}Pm, ^{140}La, ^{175}Yb, ^{166}Ho, ^{90}Y, ^{47}Sc, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{142} Pr, ^{105}Rh, ^{97}Ru, ^{68}Ge, ^{57}Co, ^{65}Zn, ^{85}Sr, ^{32}P, ^{153}Gd, ^{169}Yb, ^{51}Cr, ^{54}mn, ^{75}Se, ^{113}Sn y ^{117}Tin y metales emisores de positrones que utilizan varias tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos.

La presente invención abarca además los usos de anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados con una fracción terapéutica. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse a una fracción terapéutica tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion de metal radiactivo, por ejemplo, emisores alfa. Un agente de citotoxina o citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células.

Además, un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse a una fracción terapéutica o fracción fármacologica que modifica una respuesta biológica dada. Las fracciones terapéuticas o fracciones fármacologicas no han de interpretarse como limitadas a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción farmacológica puede ser una proteína, péptido o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, toxina del cólera o toxina diftérica, una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, α-interferón, β-interferón, factor de crecimiento de nervios, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, un agente anti-angiogénico, o, un modificador de respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfoquina.

Además, un anticuerpo puede conjugarse a las fracciones terapéuticas tales como un ión metálico radioactivo, tal como emisores alfa tales como 213Bi o quelantes

macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos, incluyendo pero sin limitar a, 131In, 131LU, 131Y, 131Ho, 131Sm, a polipéptidos. En ciertas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N ', N'', N'''-tetraacético (DOTA) el cual puede conectarse al anticuerpo a través de una molécula de enlace. Tales moléculas de enlace son comúnmente conocidas en la técnica y se describen en Denardo, (1998) Clin Cancer Res. 4 (10) :2483-90; Peterson, (1999) Bioconjug. Chem. 10 (4) :553-7, y Zimmerman, (1999) Nucl. Med. Biol. 26 (8):943-50, cada uno incorporado como referencia en sus totalidadades.

Las técnicas para conjugar las fracciones terapéuticas con anticuerpos son bien conocidas, véase, *ej.*, Arnon, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58.

Los anticuerpos también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Métodos de Producción de Anticuerpos de la Invención

Ácidos Nucleicos que Codifican los Anticuerpos

La invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos sustancialmente purificadas que codifican polipéptidos que comprenden segmentos o dominios de cadenas del anticuerpo de unión al LOX-1 descrito anteriormente. Algunos de los ácidos nucleicos de la invención comprenden la secuencia nucleotídica que codifica la región

variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 15, 35, 55,75, 95 y/o la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera mostrada en la SEC ID No: 25, 45, 85, o 105. En una realización específica, las moléculas de ácidos nucleicos son aquellas identificadas en la Tabla 1. Algunas otras moléculas de ácidos nucleicos de la invención comprenden secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas (por ejemplo, al menos 65, 80%, 95%, o 99%) a las secuencias de nucleótidos de aquellas identificadas en la Tabla 1. Cuando se expresan a partir de vectores de expresión apropiados, los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos son capaces de exhibir una capacidad de unión al antígeno de LOX-1.

También se proporcionan en la invención polinucleótidos que codifican al menos una región CDR y generalmente todas las tres regiones CDR desde la cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo de unión al LOX-1 divulgado anteriormente. Algunos otros polinucleótidos codifican la totalidad o sustancialmente todas las secuencias de región variable de la cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo de unión a LOX-1 divulgado anteriormente. Debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácido nucleico codificarán cada una de las secuencias de amino ácidos de inmunoglobulina.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden codificar tanto una región variable como una región constante del anticuerpo. Algunas de las secuencias de aminoácidos de la invención comprenden nucleótidos que codifican una secuencia de cadena pesada que es sustancialmente idéntica (ej., al menos 80%, 90%, o 99%) a la secuencia de cadena pesada divulgada en SEQ ID NO: 16, 36, 56, 76, o 96 Algunas de las secuencias de aminoácidos que comprenden nucleótidos que codifican una secuencia de cadena ligera madura que es sustancialmente idéntica (ej., al menos 80%, 90%, o 99%) a la secuencia de cadena ligera divulgada en SEQ ID NO: 26, 46, 66, 86 or 106.

Las secuencias polinucleotídicas pueden ser producidas por síntesis de ADN de fase sólida de novo o mediante mutagénesis PCR de una secuencia existente (ej., secuencias como se describe en los Ejemplos a continuación) que codifica un anticuerpo de unión a LOX-1 o su fragmento de unión. Síntesis química directa de ácidos nucleicos puede realizarse por métodos conocidos en la técnica, tales como el método del fosfotriéster de Narang, (1979) Meth. Enzymol. 68:90; el método del fosfodiéster de Brown, Meth. Enzymol. 68:109, 1979; el método de la dietilfosforamidita de Beaucage,

(1981) Tetra. Lett, 22:1859; y el método de soporte sólido de la Patente estadounidense N º 4.458.066. La introducción de mutaciones en una secuencia de polinucleótidos por PCR puede realizarse como se describe en, por ejemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, Nueva York, Nueva York, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.* (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila, Nucleic Acids Res. 19:967, y Eckert, (1991) PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

También se proporciona en la invención, vectores de expresión y células huésped para la producción de los anticuerpos de unión a LOX-1 descritos anteriormente. Varios vectores de expresión pueden emplearse para expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas de anticuerpos de unión a LOX-1 o fragmentos de unión. Vectores de expresión tanto basados en virus como no virales pueden utilizarse para producir los anticuerpos en una célula hospedera mamífera. Vectores y sistemas no virales incluyen plásmidos, vectores episomales, típicamente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN, y cromosomas artificiales humanos (véase, por ejemplo, Harrington, (1997) Nat Genet 15:345). Por ejemplo, vectores no virales útiles para la expresión de los polinucleótidos de unión a LOX-1 y polipéptidos en células mamíferas (por ejemplo, humanas) incluyen pThioHis A, B y C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B y C, (Invitrogen, San Diego, CA), vectores MPSV, y muchos otros vectores conocidos en la técnica por expresar otras proteínas. Vectores virales útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, vectores basados en SV40, virus del papiloma, virus de Epstein Barr HBP, vectores de virus vaccinia y virus Semliki Forest (SFV). Véase, Brent, (1995) supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, y Rosenfeld, (1992) Cell 68:143, 1992.

La elección del vector de expresión depende de las células huésped deseadas en las cuales el vector se va a expresar. Típicamente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadoras) que están enlazadas operativamente a los polinucleótidos que codifican una cadena o fragmento de anticuerpo de unión a LOX-1. En algunas realizaciones, un promotor inducible es empleado para evitar la expresión de secuencias insertadas, excepto bajo condiciones de inducción. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, arabinosa, lacZ, promotor de la metalotioneína o un promotor de choque térmico. Cultivos de organismos transformados pueden ampliarse bajo condiciones de no inducción sin sesgar la población a secuencias

de codificación cuyos productos de expresión son mejor tolerados por las células huésped. Además de promotores, otros elementos reguladores también pueden ser necesitados o deseados para la expresión eficaz de una cadena o fragmento de anticuerpo de unión a LOX-1. Estos elementos incluyen típicamente un codón de iniciación ATG y un sitio de unión a ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficacia de la expresión puede ser aumentada por la inclusión de potenciadores apropiados al sistema celular en uso (véase, *ej.*, Scharf, Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; and Bittner *et al.*, Meth. Enzymol., 153:516, 1987). Por ejemplo, el potenciador SV40 o potenciador CMV pueden usarse para aumentar la expresión en células huésped mamíferas.

Los vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de secuencia de señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados por secuencias insertadas de anticuerpos de unión a LOX-1. Más a menudo, las secuencias insertadas de anticuerpos de unión a LOX-1 están ligadas a secuencias señal antes de su inclusión en el vector. Los vectores que se utilizan para recibir secuencias que codifican los dominios variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos de unión a LOX-1 algunas veces también codifican las regiones constantes o partes de la misma. Tales vectores permiten la expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes conduciendo así a la producción de anticuerpos intactos o fragmentos de los mismos. Típicamente, tales regiones constantes son humanas.

Las células huésped para albergar y expresar las cadenas de anticuerpos de unión a LOX-1 pueden ser procarióticas o eucarióticas. E. coli es un huésped procariótico útil para clonar y expresar los polinucleótidos de la presente invención. Otros huéspedes microbianos adecuados para utilizar incluyen bacilos, tales como Bacillus subtilis, y otras enterobacterias, tales como Salmonella, Serratia, y varias especies de Pseudomonas. En estos huéspedes procariotas, también se pueden fabricar vectores de expresión, que típicamente contienen secuencias de control de expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos estará presente, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp), un sistema promotor de beta-lactamasa, o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores típicamente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitios de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción. Otros microbios, tales como levadura, también pueden emplearse para expresar

polipéptidos de unión a LOX-1 de la invención. También pueden utilizare células de insecto en combinación con vectores de baculovirus.

En algunas realizaciones preferidas, las células hospederas mamíferas se utilizan para expresar y producir los polipéptidos de unión a LOX-1 de la presente invención. Por ejemplo, pueden ser bien sea una línea celular de hibridoma que expresa genes de inmunoglobulina endógena (ej., el clon de hibridoma de mieloma 1D6.C9 como se describe en los Ejemplos) o una línea celular mamífera que alberga un vector de expresión exógeno (ej., las células de mieloma SP2/0 ejemplificadas a continuación). Estos incluyen cualquier célula animal o humana mortal o normal o normal o inmortal anormal. Por ejemplo, un número de líneas de células huésped adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas se han desarrollado incluyendo líneas de células CHO, varias líneas de celulas COS, células HeLa, líneas de células de mieloma, células B e hibridomas transformados. Se discute el uso de cultivos de células tisulares mamíferas para expresar polipéptidos generalmente en, por ejemplo, Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, Nueva York, NY, 1987. Vectores de expresión para células hospederas mamíferas pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, y un potenciador (véase, por ejemplo, Queen, (1986) Immunol. Rev. 89:49-68), y sitios de procesamiento de información necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme a ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras transcripcionales. Estos vectores de expresión contienen generalmente promotores derivados de genes mamíferos o de virus mamíferos. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específico al tipo celular, específicos a la etapa, y/o modulables o regulables. Promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, el promotor de la metalotioneína, el promotor tardío principal de adenovirus constitutivo, el promotor dexametasona de MMTV, el promotor SV40, el promotor MRP polIII, el promotor MPSV constitutivo, el promotor inducible por tetraciclina de CMV (tal como el promotor temprano inmediato CMV humano), el promotor CMV constitutivo, y combinaciones potenciadoras del promotor conocidas en la técnica.

Métodos para la introducción de vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo en el tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para las células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o electroporación puede utilizarse para otros huéspedes celulares. (Véase en general Sambrook, , Supra). Otros

métodos incluyen, por ejemplo, electroporación, tratamiento con fosfato de calcio, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, policatión: conjugados de ácidos nucleicos, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión a la proteína estructural VP22 del virus del herpes (Elliot y O'Hare, (1997) Cell 88:223), agente potenciador de captación de ADN, y transducción ex vivo. Para producción de alto rendimiento a largo plazo, de proteínas recombinantes, expresión estable a menudo se desea. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable cadenas de anticuerpos de unión a LOX-1 o fragmentos de unión pueden prepararse utilizando vectores de expresión de la invención que contienen orígenes de replicación virales o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Tras la introducción del vector, las células pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento de células que expresan con éxito las secuencias introducidas en medios selectivos. Las células resistentes, transfectadas establemente se pueden proliferar usando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de célula.

Generación de Anticuerpos Monoclonales de la Invención

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) pueden producirse mediante un a variedad de técnicas incluyendo metodología convencional de anticuerpos monoclonales ej., la técnica de hibridización celular somática estándar de Kohler y Milstein, 1975 Natura 256: 495. Muchas técnicas para producir anticuerpos monoclonales pueden emplearse ej., transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

Sistemas animales para preparar hibridomas incluyen los sistemas murinos, de rata y de conejo. Producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. Protocolos y técnicas de inmunización y técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la técnica. Los socios de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión son también conocidos.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo murino monoclonal preparado como

se ha descrito anteriormente. ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se puede obtener a partir del hibridoma murino de interés y se puede modificar para que contenga secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) utilizando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden vincularse a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N º 4.816.567 concedida a Cabilly). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en una estructura humana usando métodos conocidos en la técnica. Véase *ej.*, Patente EE.UU. No. 5225539 concedida a Winter, y Patente EE.UU. Nos. 5530101; 5585089; 5693762 y 6180370 concedidas a Queen.

En una cierta realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra LOX-1 se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y ratones transcromosómicos incluyen ratones conocidos en la presente como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en este documento como "ratones Ig humanos".

El HuMAb mouse ® (Medarex, Inc.) contiene minisitios de genes de inmunoglobulinas humanas que codifican secuencias de inmunoglobulinas no reordenadas de cadena pesada (μ y γ) y de cadena ligera κ, junto con mutaciones sobre las cuales se puede actuar que inactivan los sitios endógenos de cadena μ y κ (véase, por ejemplo, Lonberg, (1994) Nature 368 (6474): 856-859). En consecuencia, los ratones muestran una disminución de expresión de IgM de ratón o κ, y en respuesta a la inmunización, los transgenes introducidos humanos de cadena pesada y ligera se someten a cambio de clase y mutación somática para generar hgGk monoclonal humano de alta afinidad (Lonberg et al., (1994) supra ; revisado en Lonberg, (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg y Huszar, (1995) Intern Rev. Immunol.13: 65-93, y Harding, F. and Lonberg, N., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas llevadas por tales ratones, se describe adicionalmente en Taylor, L. *et al.*, 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et at., 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuaillon, 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, 1994 J.

Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L, 1994 International Immunology 579-591; y Fishwild, D, 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851, los contenidos de todos se incorporan específicamente por referencia en su totalidad. Véase adicionalmente las patentes estadounidense 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; y 5,770,429; todas concedidas a Lonberg y Kay; Patente EE.UU. No. 5,545,807 concedidas a Surani; Publicación PCT Nos. WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas concedidas a Lonberg y Kay; y Publicación PCT No. WO 01/14424 to Korman.

En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención pueden producirse utilizando un ratón que lleva las secuencias de inmunoglobulina humana en los transgenes y transcromosomas tal como un ratón que lleva un transgén humano de cadena pesada y un transcromosoma humano de cadena ligera. Tales ratones, conocidos en la presente como "ratones KM", se describen en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 a Ishida.

Aún más, los sistemas alternativos de animales transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden utilizar para producir los anticuerpos de unión a LOX-1 de la invención. Por ejemplo, un sistema transgénico alternativo conocido como el XenoMouse (Abgenix, Inc.) se puede utilizar. Tales ratones se describen en ej., Patente EE.UU. No. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6, 150,584 y 6,162,963 a Kucherlapati.

Además, los sistemas alternativos de animales transcromosómicos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se puede utilizar para producir los anticuerpos de unión a LOX-1 de la invención. Por ejemplo, los ratones con un transcromosoma de cadena pesada humana y un trancromosoma de cadena ligera humana, conocidos como "ratones TC" pueden utilizarse; tales ratones se describen en Tomizuka , (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97:722-727. Además, vacas que llevan transcromosomas humanos de cadena pesada y ligera se han descrito en la técnica (Kuroiwa et al., (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) y se pueden utilizar para producir los anticuerpos de unión a LOX-1 de la invención.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar usando métodos de presentación en fagos para la selección de bibliotecas de

genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos son establecidos en la técnica o se describen en los ejemplos a continuación. Véase, por ejemplo: Patentes EE.UU. Nos 5,223,409; 5,403,484; y 5,571,698 concedidas a Ladner; Patentes EE.UU. Nos. 5,427,908 y 5,580,717 concedidas a Dower; Patentes EE.UU. Nos. 5.969.108 y 6.172.197 concedidas a McCafferty; Patentes EE.UU. Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 y 6,593,081 otorgadas a Griffiths.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar usando ratones SCID en los cuales las células inmunes humanas se han reconstituido tal que una respuesta de anticuerpos humanos puede generarse tras la inmunización. Tales ratones se describen en ej., Patentes EE.UU. No. 5,476,996 y 5,698,767 concedidas a Wilson.

Modificación genética de regiones Variables FW o Fc

Los anticuerpos genéticamente modificados de la invención incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones a residuos variables dentro de VH y/o VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente tales modificaciones de regiones variables están hechas para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en "retro mutar" uno o más residuos de región variable a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sido objeto de mutación somática puede contener residuos variables que difieren de la secuencia de línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Tales residuos pueden ser identificados mediante la comparación de las secuencias de región variable de anticuerpos con las secuencias de línea germinal de las que se deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región variable a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser "retromutadas" a la secuencia de la línea germinal, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio. Tales anticuerpos "retromutados" también pretenden ser contemplados por la invención.

Otro tipo de modificación genética de región marco implica la mutación de uno o más residuos dentro de la región marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epítopos de células T para disminuir así la inmunogenicidad potencial del

anticuerpo. Este enfoque también se conoce como "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de patente de EE.UU. No. 20030153043 por Carr.

Además o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro de las regiones marco o CDR, los anticuerpos de la invención pueden ser diseñados para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media en suero, fijación del complemento, unión al receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede ser modificado químicamente (por ejemplo, una o más fracciones químicas se pueden unir al anticuerpo) o se puede modificar para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe en más detalle a continuación. La numeración de los residuos en la región Fc es del índice EU de Kabat.

En una realización, la región de bisagra de CH1 puede ser modificada de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, se aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de EE.UU. No. 5.677.425 por Bodmer. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región de bisagra Fc de un anticuerpo es mutada para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones aminoácidas se introducen en la región de interfaz de dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra de tal manera que el anticuerpo queda con una unión defectuosa a SpA (proteína estafilocóccica A) con relación a la unión nativa de SpA con el dominio Fc-bisagra. Este enfoque se describe en detalle adicional en la Patente EEUU. No. 6.165.745 por Ward.

En otra realización, el anticuerpo puede ser modificado para aumentar su vida media biológica. Diversos enfoques son posibles. Por ejemplo, una o más de las siguientes mutaciones pueden ser introducidas: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de EE.UU. N º 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la vida media biológica, el anticuerpo puede ser alterado dentro de la región CH1 o CL para contener un epítopo de unión al receptor silvestre tomado de dos bucles de un dominio

CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en la patente de EE.UU. Nos. 5,869,046 y 6,121,022 por Presta.

En aún otras realizaciones, la región Fc puede ser alterada mediante la sustitución de al menos un residuo aminoácido por un residuo aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden ser sustituidos por un residuo aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada para un ligando efector pero retenga la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector al que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en detalle en las Patentes EE.UU. No. 5,624,821 y 5,648,260, ambas por Winter.

En otra realización, uno o más aminoácidos seleccionados a partir de residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un residuo de aminoácido diferente tal que el anticuerpo tenga unión unión de C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) abolida y/o disminuida. Este enfoque se describe adicionalmente en detalle en las Patentes EE.UU. No. 6,194,551 por Idusogie.

En otra realización, uno o más residuos de aminoácidos se pueden alterar para alterar la capacidad del anticuerpo para fijarse al complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351 por Bodmer.

En aún otra realización, la región Fc puede ser modificada para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ mediante la modificación de uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072 por Presta. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRl, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han mapeado y variantes con unión mejorada se han descrito (véase Shields et al., (2001) J. Biol. Chen. 276:6591-6604).

En aún otra realización, la glicosilación de un anticuerpo es modificada. Por ejemplo, un anticuerpo aglicosilado puede fabricarse (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede ser alterada, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el “antígeno”. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden

lograr, por ejemplo, mediante la alteración de uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpos. Por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos pueden realizarse que resulten en la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región variable para eliminar así la glicosilación en dicho sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Este enfoque se describe adicionalmente en detalle en las Patentes EE.UU. No. 5.714.350 y 6.350.861 por Presta.

Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede ser hecho que tenga un tipo de alteración de la glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosil o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNAc de bisección aumentada. Tales patrones de glicosilación alterados han demostrado que aumentan la capacidad de ADCC de anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células huésped para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención para producir con ello un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 por Hang, describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, que codifica una fucosiltransferasa, de tal manera que los anticuerpos expresados en tal línea celular exhiben hipofucosilación. La publicación PCT WO 03/035835 por Presta describe una línea celular CHO variante, células Lecl3, con una capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos unidos por Asn (297), resultando también en hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields et al ., (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La publicación PCT WO 99/54342 por Umana et al. describe líneas celulares modificadas genéticamente para expresar glicosil transferasas modificadoras de glicoproteínas (por ejemplo, beta (1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas presenten estructuras de GlcNAc de bisección aumentada que resulta en actividad ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana et al., (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

Métodos para Modificar Anticuerpos Alterados

Como se discutió anteriormente, los anticuerpos de unión a LOX-1 que tienen secuencias VH y VL o secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa mostradas en la presente pueden utilizarse para crear nuevos anticuerpos de unión a LOX-1 mediante la modificación de las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de longitud completa, secuencias VH y/o VL, o la región constante unida a las mismas. Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se utilizan las características estructurales de un anticuerpo de unión a LOX-1 de la invención para crear anticuerpos estructuralmente relacionados de unión a LOX-1 que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tales como la unión a LOX-1 humana y también la inhibición de una o más propiedades funcionales de LOX-1 (por ejemplo, inhiben la unión de LOX-1 al receptor de LOX-1, inhiben la proliferación celular dependiente de LOX-1).

Por ejemplo, una o más regiones CDR de los anticuerpos de la presente invención, o mutaciones de los mismos, se pueden combinar de forma recombinante con regiones de estructura conocida y / o otros CDR para crear de forma recombinante por ingeniería, anticuerpos adicionales de unión a LOX-1 de la invención, como se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen aquellas descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de modificación es una o más de las secuencias VH y/o VL proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo manipulado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tiene una o más secuencias VH y/o VL proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. Más bien, la información contenida en la(s) secuencia(s) se utiliza como material de partida para crear una secuencia de "segunda generación" derivada de la secuencia original (s) y luego las secuencias de "segunda generación" se preparan y expresan como una proteína.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo de unión a LOX-1 que consta de una secuencia de anticuerpos de región variable de cadena pesada que tiene una secuencia CDR1 seleccionada a partir del grupo que consta de SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, y 88, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, y 89, y/o una secuencia CDR3 seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 10, 30, 50 y 70, y 90; y una secuencia de anticuerpos de región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de CDR1 seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 18, 38, 58, 78, y 98, una

secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, y 99, y/o una secuencia CDR3 seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, y 100; alterar al menos un residuo aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpos de región variable de cadena pesada y / o la secuencia de anticuerpos de región variable de cadena ligera para crear al menos una secuencia alterada de anticuerpos, y expresar la secuencia alterada de anticuerpos como una proteína.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo de unión a LOX-1 que consta de una secuencia de anticuerpos de región variable de cadena pesada que tiene una secuencia CDR1 seleccionada a partir del grupo que consta de SEQ ID NOs: 11, 31, 51, 71, y 91, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 12, 32, 52, 72, y 92, y/o una secuencia CDR3 seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 13, 33, 53 y 73, y 93; y una secuencia de anticuerpos de región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de CDR1 seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 21, 41, 61, 81, y 101, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 22, 42, 62, 82, y 102, y/o una secuencia CDR3 seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 23, 43, 63, 83, y 103; alterar al menos un residuo aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpos de región variable de cadena pesada y / o la secuencia de anticuerpos de región variable de cadena ligera para crear al menos una secuencia alterada de anticuerpos, y expresar la secuencia alterada de anticuerpos como una proteína.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo de unión a LOX-1 optimizado para expresión en una célula mamífera que consta de: una secuencia de anticuerpos de cadena pesada de longitud completa que tiene una secuencia seleccionada del grupo de SEQ ID NOs: 16, 36, 56, 76 o 96; y una secuencia de anticuerpos de cadena ligera de longitud completa que tiene una secuencia seleccionada del grupo de 26, 46, 66, 86, o 106; alterando al menos un residuo aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpos de cadena pesada de longitud completa y/o la secuencia de anticuerpos de cadena ligera de longitud completa para crear al menos una secuencia alterada de anticuerpos; y expresar la secuencia alterada de anticuerpos como una proteína. En una realización, la alteración de la cadena pesada o ligera está en la región variable de la cadena pesada o ligera.

La secuencia alterada de anticuerpos también se puede preparar al seleccionar bibliotecas de anticuerpos que tienen secuencias CDR3 fijas o determinantes de unión esenciales como se describe en US2005/0255552 y diversidad en las secuencias CDR1 y CDR2. La selección se puede realizar de acuerdo con cualquier tecnología de selección adecuada para selección de anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos, tales como tecnología de presentación en fagos.

Las técnicas estándar de biología molecular se pueden utilizar para preparar y expresar la secuencia alterada de anticuerpos. El anticuerpo codificado por la secuencia de anticuerpos alterada es aquel que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos de unión a LOX-1 descritos en la presente, tales propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a, unión específica a LOX-1 humano, de cinomolgus, de rata y/o de ratón y el anticuerpo inhibe la proliferación celular dependiente de LOX-1 en un ensayo de proliferación de células F36E y/o Ba/F3-LOX-1R.

Y En ciertas realizaciones de los métodos de modificación de anticuerpos de la invención, se pueden introducir mutaciones al azar o selectivamente a lo largo de toda o parte de una secuencia de codificación de anticuerpos de unión a LOX-1 y los anticuerpos de unión a LOX-1 resultantes modificados pueden ser clasificados para la actividad de unión y/o otras propiedades funcionales como se describe en la presente. Métodos mutacionales se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 de Short describe métodos para la creación y selección de mutaciones de anticuerpos por medio de mutagénesis de saturación, montaje de ligación sintética, o una combinación de los mismos. Alternativamente, la publicación PCT WO 03/074679 por Lazar describe métodos de uso de métodos computacionales de detección para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos se han modificado para retirar sitios de deamidación. La deaminación se conoce por producir cambios estructurales y funcionales en un péptido o proteína. La deaminación puede resultar en bioactividad disminuida, así como en alteraciones en farmacocinética y antigenicidad de la proteína farmacéutica. (*Anal Chem*. 2005 Mar 1;77(5):1432-9).

En ciertas formas de realización de la invención, los anticuerpos han sido diseñados para aumentar el pI y mejorar sus propiedades tipo fármacos. El pI de una proteína es un factor determinante clave de las propiedades biofísicas generales de una molécula. Los anticuerpos que tienen pIs bajos han sido conocidos por ser menos solubles, menos estables, y con tendencia a la agregación. Además, la purificación de los anticuerpos con bajo pI es difícil y puede ser problemática especialmente durante escalado para uso clínico. Aumentar el pI de los anticuerpos anti-LOX-1, o Fabs, de la invención mejoró su solubilidad, lo que permite que los anticuerpos se puedan formular a concentraciones más altas (> 100 mg / ml). La formulación de los anticuerpos a concentraciones altas (por ejemplo> 100mg/ml) ofrece la ventaja de poder administrar dosis más altas de los anticuerpos a los ojos de los pacientes a través de inyecciones intravítreas, que a su vez pueden permitir reducida frecuencia de dosificación, una ventaja significativa para el tratamiento de enfermedades crónicas, incluyendo trastornos cardiovasculares. PIs más altos también pueden aumentar el reciclaje mediado por FcRn de la versión IgG del anticuerpo permitiendo así al fármaco persistir en el cuerpo durante una duración más larga, requiriendo menos inyecciones. Por último, la estabilidad general de los anticuerpos se mejora significativamente debido al pI más alto resultando en una mayor vida útil y bioactividad *in vivo*. Preferiblemente, el pI es mayor o igual a 8.2.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar usando ensayos estándares disponibles en la técnica y/o divulgados en la presente, tales como los indicados en los ejemplos (por ejemplo, ELISA).

Usos profilácticos y Terapéuticos

Los anticuerpos que se unen a LOX-1 como se describe en la presente, pueden utilizarse a una concentración terapéuticamente útil para el tratamiento de una

enfermedad o trastorno asociado niveles aumentados de LOX-1 y/o actividad al administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de la invención La presente invención proporciona un método de tratamiento de trastornos cardiovasculares asociados con LOX-1, administrando a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de los anticuerpos de la invención. La presente invención proporciona un método de tratamiento de trastornos cardiovasculares asociados con LOX-1, administrando a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de los anticuerpos de la invención.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar, entre otras cosas, para evitar tratar, prevenir, mejorar condiciones o trastornos asociados con LOX-1, incluyendo pero no limitado a trastornos cardiovasculares, disfunción de células endoteliales, trastornos de las células endoteliales, aterosclerosis, arteriosclerosis, hipertensión, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, ldiabetes mellitus, deficiencia de óxido nítrico, infarto de miocardio, estrés oxidativo vascular, isquemia miocárdica, isquemia-reperfusión, sepsis, nefropatía diabética, enfermedad renal, cardiomiopatía, insuficiencia cardiaca, enfermedad arterial periférica, enfermedad cardiaca coronaria, claudicación (por ejemplo, claudicación intermitente, claudicación de Rutherford Clase II / III), enfermedad arterial periférica (PAD), angina (por ejemplo, angina refractaria), enfermedad arterial coronaria (CAD) (por ejemplo, debido a la aterosclerosis de las arterias que alimentan el corazón), accidente cerebrovascular, y vasodilatación anormal dependiente del endotelio.

El tratamiento y / o prevención de trastornos cardiovasculares, por ejemplo, trastornos cardiovasculares asociados a LOX-1, se pueden determinar por un profesional de la salud usando mediciones clínicamente relevantes de la función vascular. Tratamiento de los trastornos cardiovasculares asociados con LOX-1 se refiere a cualquier acción (por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-LOX-1 descrito en el presente documento) que resulta en, o se contempla para dar lugar a, la mejora o preservación de la función vascular, anatomía vascular y/o parámetros hemodinámicos. Además, la prevención en que se refiere a condiciones o trastornos asociados con trastornos cardiovasculares se refiere a cualquier acción (por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-LOX-1 descrito en el presente documento) que previene o retarda un empeoramiento en la función vascular, y/o un parámetro de trastornos cardiovasculares, tal como se define en la presente memoria, en un paciente en riesgo de dicho empeoramiento.

Como los niveles de oxLDLs y LOX-1 solubles se aumentaron tanto en angina estable como en síndromes isquémicos agudos, se espera que los anticuerpos anti-LOX-1 de la invención inhiban el estrés oxidativo vascular, reduzcan la isquemia de miocardio y angina de pecho y mejoren la tolerancia al ejercicio; dichos anticuerpos tienen el potencial para convertirse en el primer tratamiento antianginoso modificador de la enfermedad disponible.

La eficacia de dicha administración terapéutica se puede medir por una evaluación serial de la frecuencia y duración de los eventos isquémicos transitorios (control de ECG ambulatorio) y angina de pecho (cuestionario de angina de pecho de Seattle), y las pruebas de tolerancia al ejercicio en serie con la opción de registro de perfusión. La eficacia también se puede medir mediante el uso de biomarcadores tales como oxLDL de plasma, LOX-1 soluble, y biomarcadores de estrés oxidativo (isoprostanos F2-, malondialdehído, mieloperoxidasa).

"Claudicación", como se usa aquí, incluye claudicación severa y otros términos similares, y describe un impedimento de movilidad y alta necesidad médica no cubierta. La claudicación es una condición caracterizada por una menor isquemia de las extremidades, causando fatiga muscular, dolor por el esfuerzo se alivia con el reposo, movilidad limitada y reducida calidad de vida, y es causada por la aterosclerosis y vasodilatación anormal (por ejemplo, alterada) dependiente del endotelio. Su prevalencia en los EE.UU. es de 8-12 millones de pacientes. Entre pacientes con claudicación intermitente, el 7% se someterá a una cirugía de derivación de extremidades inferiores, 4% requerirá amputaciones mayores, y el 16% desarrollará empeoramiento de claudicación. Los eventos cardiovasculares, como el infarto de miocardio y accidente cerebrovascular, se producen en el 20% de los enfermos de claudicación grave de más de 5 años. El tratamiento actual es quirúrgico y el tratamiento a través de medios menos invasivos, como la administración de los anticuerpos anti-LOX-1 de la invención, representaría un enorme avance terapéutico.

La eficacia de dicha administración terapéutica puede ser medida por una evaluación seriada de claudicación inducida por el ejercicio (flexión plantar y cinta de correr), con puntos finales para incluir tiempo de aparición de dolor, duración de ejercicio y distancia recorrida. La eficacia también se puede medir mediante el uso de biomarcadores mecanicistas tales como oxLDL plasmático y LOX-1 soluble;

biomarcadores de estrés oxidativo (F2-isoprostanos, malondialdehído, mieloperoxidasa); cambios inducidos por el ejercicio en el flujo de extremidades inferiores y saturación muscular de O2.

Otro alta necesidad médica no satisfecha para la cual los anticuerpos anti-LOX-1 de la invención serían terapéuticamente útiles es la angina de pecho refractaria. Angina recurrente en sujetos afectados a pesar del tratamiento médico óptimo (por ejemplo, administración de beta-bloqueadores de de acción prolongada, nitrato y bloqueadores de canales de calcio), sin posibilidad de revascularización. La angina refractaria es una condición caracterizada por dolor en el pecho debido a la isquemia del músculo cardíaco, por lo general debido a la obstrucción o espasmo de las arterias coronarias (por ejemplo, de la enfermedad de las arterias coronarias), con síntomas debilitantes, actividad física muy limitada y la mala calidad de vida. Los 1-1.8 millones de pacientes que sufren de angina de pecho refractaria en EE.UU. experimentan aumento de la mortalidad cardiovascular, a razón de 10% por año; al menos 100.000 nuevos casos de angina refractaria surgen por año.

Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar en combinación con otros agentes para la prevención, tratamiento, o mejora de trastornos asociados con LOX-1 . Por ejemplo, las terapias de estatina se pueden utilizar en combinación con los anticuerpos LOX-1 y los fragmentos de unión a antígeno de la invención para el tratamiento de pacientes con trastornos cardiovasculares.

Composiciones Farmacéuticas

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de unión a LOX-1 (fragmentos intactos o de unión) formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener adicionalmente uno o más de otros agentes terapéuticos que son adecuados para tratar o prevenir, por ejemplo, trastornos cardiovasculares. Los vehículos farmacéuticamente aceptables potencian o estabilizan la composición, o se pueden utilizar para facilitar la preparación de la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos,

agentes retardantes de isotónicos y de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por una variedad de métodos conocidos en la técnica. La vía y / o modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. Se prefiere que la administración sea intravítrea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea, o se administra próxima al sitio del objetivo. El vehículo farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para administración intravítrea, intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

La composición debe ser estéril y fluida. La fluidez adecuada puede mantenerse por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de particula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar de acuerdo con métodos bien conocidos y practicados de forma rutinaria en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; and Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferiblemente bajo condiciones GMP. Típicamente, una dosis terapéuticamente efectiva o dosis eficaz de un anticuerpo de unión a LOX-1 se emplea en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los anticuerpos de unión a LOX-1 se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, varias dosis divididas

pueden ser administradas con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria como se utiliza en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a ser tratados; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas de la presente invención, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica anterior del paciente a tratar, y factores de este tipo.

Un médico o veterinario puede empezar con dosis de los anticuerpos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de trastornos cardiovasculares descritos en este documento variarán dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosificaciones de tratamiento necesitan ser valoradas para optimizar la seguridad y la eficacia. Para la administración sistémica con un anticuerpo, la dosificación oscila de 0,0001 a 100 mg / kg aproximadamente, y más habitualmente de 0,01 a 15 mg / kg, del peso corporal del huésped. Para administración

intravitrea con un anticuerpo, la dosificación puede oscilar de 0.1 mg/ojo a 5mg/ojo. Por ejemplo, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.7 mg/ml, 0.8 mg/ml, 0.9 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.1 mg/ml, 1.2 mg/ml, 1.3 mg/ml, 1.4 mg/ml, 1.5 mg/ml, 1.6 mg/ml, 1.7 mg/ml, 1.8 mg/ml, 1.9 mg/ml, 2.0 mg/ml, 2.1 mg/ml, 2.2 mg/ml, 2.3 mg/ml, 2.4 mg/ml, 2.5 mg/ml, 2.6 mg/ml, 2.7 mg/ml, 2.8 mg/ml, 2.9 mg/ml, 3.0 mg/ml, 3.1 mg/ml, 3.2 mg/ml, 3.3 mg/ml, 3.4 mg/ml, 3.5 mg/ml, 3.6 mg/ml, 3.7 mg/ml, 3.8 mg/ml, 3.9 mg/ml, 4.0 mg/ml, 4.1 mg/ml, 4.2 mg/ml, 4.3 mg/ml, 4.4 mg/ml, 4.5 mg/ml, 4.6 mg/ml, 4.7 mg/ml, 4.8 mg/ml, 4.9 mg/ml, o 5.0 mg/ml. Un régimen de tratamiento de ejemplo implica la administración sistémica una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Un régimen de tratamiento de ejemplo implica la administración sistémica una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses, o como sea necesario (PRN).

El anticuerpo usualmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser semanal, mensual o anual. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles en sangre del anticuerpo de unión a LOX-1 en el paciente. Además intervalos de dosificación alternativos se pueden determinar por un médico y ser administrados mensualmente o como sea necesario para ser eficaces. En algunos métodos de administración sistémica, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1000 µg / ml y en algunos métodos 25-500 µg / ml. Alternativamente, el anticuerpo pueden ser administrado como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. Dosis y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados muestran la vida media más larga que la de los anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosis relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento para el resto de sus vidas. En las aplicaciones terapéuticas, una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos a veces es necesario hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferiblemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, al paciente se puede administrar un régimen profiláctico.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la invención pero no para limitar su ámbito de aplicación. Otras variantes de la invención serán fácilmente evidentes para un experto normal en la técnica y están contempladas por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Preparación de LOX-1 Soluble Humana Recombinante Purificada para su Uso como Antígeno

Una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular (residuos de aminoácidos 61 a 273) de polipéptido LOX-1 humano con el péptido señal de extremo N de CD33 humano, etiqueta de purificación (EFHR), y la secuencia de biotinilación BirA (GLNDIFEAQKIEWHE) (SEC ID N º 144) se subclonó en el vector de expresión de células de mamífero pRS5a. El plásmido resultante, pRS5a_APP-Avi-humano-sLOX-1 (61-273), se transfectó transitoriamente en células HEK293T utilizando métodos de transfección de polietilenimina (PEI) estándares. Las células fueron propagadas en cultivo en suspensión en medio M11V3 de Novartis (Bioconcept) y la transfección se llevó a cabo en concentración final de células de 1.4 x 10_6 células / ml en 5 litros de medio usando un Wave Bioreactor.

Cinco horas después de la transfección, se añadieron 5 litros de medio libre de suero ExCell VPRO (Sigma). Las células se cultivaron a 37 ° C y CO_2 al 5% durante 10 días. Las células fueron cosechadas mediante centrifugación, seguido de filtración con un filtro estéril de 0.22 micras. El sobrenadante clarificado se pasó sobre 20 ml de una resina de afinidad anti-APP (patentada por Novartis) equilibrada con PBS. La columna se lavó con PBS hasta que se alcanzó la línea de base a una absorbancia de 280 nm. A continuación, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de PBS que contenía Triton X-100 al 1% y tri-n-butilfosfato al 0,3%, seguido por 25 volúmenes de columna de PBS. La proteína SLOX-1 se eluyó luego con citrato de sodio a 50 mM, pH 3.0, y las fracciones se neutralizaron con volumen de 1/10 de Tris s 1 M, pH 9.0. Las fracciones relevantes se combinaron y se dializaron exhaustivamente frente a PBS, luego se tomaron alícuotas y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. El análisis analítico de

tamaño mostró que el material de proteína LOX-1 soluble purificado estaba en un % mayor al 95% en forma de dímero, que es la forma esperada de esta proteína.

Ejemplo 2: Preparación de Células HEK293 Transfectadas de LOX-1 Humanas

Para probar la especificidad de unión y la actividad funcional de anticuerpos específicos anti-LOX1, se generaron células HEK293 que sobreexpresan de forma estable LOX-1 humana. Utilizando métodos de transfección de Lipofectamina 2000 estándares, se transfectaron células HEK293-6E con un plásmido de expresión de mamífero que codifica ADNc de LOX-1 de longitud completa humano y resistencia a higromicina. Los cultivos transfectados fueron evaluados para la expresión en la superficie de LOX-1 mediante citometría de flujo en el día tres después de la transfección y después se sometieron a selección de higromicina (200 □g / ml) para enriquecer en células que expresan de forma estable. Las poblaciones clonales se obtuvieron mediante dos rondas secuenciales de dilución limitante y la expresión se confirmó mediante citometría de flujo. Se seleccionaron exclusivamente clones que mantenian estables la expresión de LOX-1 durante más de cuatro semanas en cultivo y se utilizaron en ensayos de caracterización de anticuerpos posteriores.

Ejemplo 3: Preparación de anticuerpos monoclonales

La proteína de LOX-1 humana recombinante se preparó dentro del laboratorio como se describe en el Ejemplo 1, y se utilizó como inmunógeno para la generación de clones de hibridoma anti-LOX-1. El antígeno LOX-1 en PBS se mezcló con un volumen igual de adyuvante de Freund para potenciar la respuesta inmune en ratones Balb / c. Un adyuvante de Freund completo (Sigma F5881) se utilizó para la primera inyección y un adyuvante de Freund incompleto (Sigma F5506) para las inmunizaciones posteriores.

Inmunizaciones de animales y recolección de muestras se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos de uso de animales estándar aprobados por la IACUC. Brevemente, los ratones Balb / c VAF hembra a la edad de 5-6 semanas (Charles River Laboratories) se inmunizaron con la emulsión de antígeno de proteína de LOX-1 humana

y adyuvante. Los ratones se inmunizaron por vía subcutánea durante 4 veces con aproximadamente 20 µg de proteína en 100 µl de la mezcla de antígeno-adyuvante por animal. Las inyecciones se realizaron cada 2-3 semanas para desarrollar la respuesta inmune en los animales. Tres días antes de la fusión celular para la generación de hibridoma, los ratones fueron intraperitonealmente inyectados una vez más con la misma dosis de antígeno LOX-1 mezclado con adyuvante de Freund incompleto, y se sacrificaron para la recolección de bazo en condiciones quirúrgicas esterilizadas en el día de la fusión celular .

Los bazos de los ratones inmunizados se molieron entre dos láminas de microscopio estériles y congeladas para prepararse para suspensión de células individuales en medio RPMI-1640. Las células del bazo se precipitaron y se lavaron dos veces con medio RPMI-1640. Para que las fusiones de células generaran clones de hibridoma, los esplenocitos se mezclaron y se fusionaron con células de mieloma murino P3X63Ag8.653 (Kearney JF et al., 1979. J. Immunol., 123:1548-1550) usando polietilenglicol-1500 como fusógeno según protocolos de fusión estándar (Zhang C. 2012. Methods Mol. Biol. 901:117-135). Tras las fusiones celulares y centrifugación, las células se suspendieron en medio RPMI-1640 completo (200mL/bazo) que contiene suplemento de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) (Sigma H-0262), y se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning-Costar 3596) en 200µL de suspensión de células por pozo.

Después de la incubación a 37 ° C, CO_2 al 5% durante 3-4 días, 100 µl de sobrenadante de cultivo se retiro de cada pozo de las placas y se sustituyo con un volumen igual de medio RPMI-1640 completo que contiene suplemento de hipoxantina-timidina (HT) (Sigma H-0137). Las placas se siguieron incubando en una atmósfera de CO2 al 5% a 37 ° C hasta que los clones de hibridoma habían crecido colonias suficientemente grandes para permitir tamizado de anticuerpos.

Ejemplo 4: Tamizado, Subclonación y Selección de Hibridoma

En la semana 2 después de la fusión, cuando las células de hibridoma habían crecido hasta convertirse en medio-confluente en los pozos de la placa y el sobrenadante

había cambiado a un color naranja, los sobrenadantes de hibridoma se tomaron muestras de las placas para el tamizado de anticuerpos mediante inmunoensayos, tales como la citometría de flujo de inmunofluorescencia para antígenos basados en células LOX-1 o ELISA para antígeno proteico de LOX-1. Para la detección primaria, los sobrenadantes de hibridoma se ensayaron mediante citometría de flujo utilizando células 293-6E transfectadascon LOX-1 frente a las células no transfectadas. Brevemente, células 293-6E transfectadas con LOX-1 humano, o las células no transfectadas, se incubaron respectivamente con 50 µl de sobrenadante de hibridoma, seguido de marcaje con conjugado de fragmento de fluoresceína-AffiniPure Fab con IgG de cabra anti-ratón (H + L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories), y se analizaron mediante citometría de flujo con FACSCalibur de Becton Dickinson en un modo automático.

Mediante análisis de citometría de flujo, se identificaron clones de hibridoma que reaccionaron con células 293-6E transfectadas con LOX-1 pero no con células no transfectadas y se seleccionaron a partir de placas de fusión. Los clones de hibridoma deseados se expandieron en placas T12 para su posterior caracterización. El clon de hibridoma de interés se subclonó mediante dilución limitante y la recolección microscópicamente de colonias individuales para alcanzar una población monoclonal que produce un anticuerpo monoclonal específico a LOX-1. Los subclones de hibridoma seleccionados se expandieron en placas T12 y se congelaron para la criopreservación o se utilizaron para la producción de anticuerpos monoclonales. Los isotipos de anticuerpos monoclonales específicos derivados de clones de hibridoma se determinaron mediante el uso de reactivos de isotipo disponibles comercialmente.

En base a los resultados del cribado, se identificó un panel de 24 clones de hibridoma específicos a LOX-1 humano y se seleccionaron a partir de la inmunización de ratones con antígeno de LOX-1 humano. Uno de estos clones de hibridoma, Clon 39.1E2E10 (abreviado como E2E10, y en este documento se refiere como E2E10 o murino parental), produjo un anticuerpo monoclonal de IgG1 con una cadena ligera kappa, y fue seleccionado como uno de los candidatos principales para la secuenciación de anticuerpos y humanización en base a sus propiedades aglutinantes de LOX-1.

Ejemplo 5: Detección de Anticuerpos Monoclonales para la Inhibición de la Unión de OxLDL a LOX-1

Los anticuerpos LOX-1 se purificaron a partir de sobrenadantes de hibridoma utilizando métodos estándar (por ejemplo, cromatografía de afinidad de la proteína A).

La proteína LOX-1 (61-273) humana soluble en APP-Avi purificada preparada como se describe en el Ejemplo 1 se biotiniló como sigue: proteína LOX-1 soluble purificada (8-10 mg) en 50 mM de buffer de Bicina pH 8,3 en una concentración de aproximadamente 1 mg / ml se incubó en presencia de ATP 10 mM, 10 mM de acetato de magnesio, biotina 0,1 mM, y BirA biotina ligasa (Avidity) a 30 ° C durante 1 hora y luego se coloca a 4 º C durante la noche. La proteína se purificó usando una columna S200 Superdex 16/60 equilibrada con PBS. Las fracciones relevantes se combinaron y la proteína se concentró hasta aproximadamente una concentració de1 mg / ml, se tomaron alícuotas, y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. El porcentaje de biotinilación se evaluó mediante espectrometría de masas mapeo de péptidos de las muestras no biotiniladas y biotiniladas. Típicamente, el rendimiento de biotinilación fue >95%, y no se detectó material no biotinilado. El análisis analítico de tamaño mostró que el material biotinilado estaba en un % del 100% en forma de dímero, que es la forma esperada de esta proteína.

A continuación, la proteína de LOX-1 soluble biotinilada se diluyó a la concentración de 2,5 □g / ml en PBS, y 0,1 ml de esta solución se añadió a pozos de una placa de 96 pozos de NeutrAvidin (número de catálogo Pierce 15128), y a continuación, la placa se incubó durante la noche a 4 ° C. La placa se lavó tres veces con PBS, y luego se bloqueo mediante la adición de 0,3 ml por pozo de Block Ace al 25% (número de catálogo ABD Serotec BUF029) y la incubación de la placa a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación suave. La placa se lavó una vez con PBS. Se prepararon diluciones en serie de anticuerpos LOX-1 diluidos en BSA / PBS al 1%, y 0.1 ml de anticuerpos diluidos se añadieron a la placa. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, después se lavó tres veces con PBS. A continuación, 0.1 ml de oxLDL (OxLDL de unión alta, Kalen Biomédica número de catálogo 770212-7) diluido en BSA / PBS al 1% a una concentración final de 2 ug / ml.

Para generar una curva estándar LDLox, varias concentraciones de oxLDL se pusieron a prueba en ausencia del anticuerpo LOX-1, utilizando una concentración superior de 20 ug / ml oxLDL. Luego, la placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, y después la placa se lavó tres veces con PBS. A continuación, se agregó 0.1 ml / pozo de anticuerpo anti-ApoB100 conjugado con HRP (The Binding Site, Inc., número de catálogo PP086) diluido a 1:1000 en BSA / PBS al 1%, y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. La placa se lavó 6 veces con PBS. A continuación se añadió 0,1 ml/pozo de sustrato de TMB y la placa se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La solución de parada (ácido sulfúrico 2N, 50 □L / pozo) se añadió a cada pozo, y la absorbancia óptica a 450 nm se midio usando un lector de placas adecuado.

Ejemplo 6: Humanización de Anticuerpos Monoclonales

Anticuerpo monoclonal de ratón E2E10 fue Humaneered™ para llevar su secuencia de proteína más cerca a una secuencia de la línea germinal humana y disminuir su inmunogenicidad. Tecnología Humaneering ™ está disponible a través de KaloBios de San Francisco del Sur. Anticuerpos Humaneering ™ genera anticuerpos humanos diseñados con las secuencias de la región V que tienen una alta homología con una secuencia de línea germinal humana al tiempo que conserva la especificidad y la afinidad de los anticuerpo precursores o de referencia (Publicación de Patente de EE.UU. 2005/0255552 y 2006/0134098). El proceso identifica primero los determinantes de especificidad de unión (BSD) a antígeno mínimos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de una referencia Fab (típicamente secuencias dentro de la CDR3 de cadena pesada y la CDR3 de cadena ligera). Mientras se mantienen estas BSDs de cadena pesada y ligera en todas las bibliotecas construidos durante el proceso de Humaneering™, cada biblioteca es centrada en epítopo, y los anticuerpos completamente Humaneered™ finales retienen la especificidad de epítopo del anticuerpo de ratón original.

A continuación, se generan bibliotecas de casetes (en el que una porción de la región variable de cadena pesada o ligera del Fab de ratón se reemplaza con una biblioteca de secuencias humanas). Un sistema de secreción bacteriano se utiliza para

expresar los miembros de la biblioteca en forma de fragmentos de anticuerpos Fab, y la librería se examina para encontrar los Fabs que se unen al antígeno usando un ensayo de unión sencilla de colonia (CLBA) Los clones positivos se caracterizaron adicionalmente para identificar los que tienen la afinidad más alta. Los casetes humanos identificados que soportan la unión en el contexto de secuencias murinas residuales se combinan entonces en una librería de exposición final para generar regiones V completamente humanas.

Los Fabs Humaneered™ resultantes tienen secuencias en segmento V derivadas de bibliotecas humanas, retienen las secuencias BSD cortas identificadas dentro de las regiones CDR3, y tienen 4 regiones marco de línea germinal humana. Estos Fab se convierten a IgG completo mediante clonación de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera en vectores de expresión de IgG. Anticuerpos completamente Humaneered™ generados en este proceso conservan la especificidad de unión del anticuerpo murino precursor, típicamente tienen afinidad equivalente o superior para el antígeno que el anticuerpo precursor, y tienen regiones V con un alto grado de identidad de secuencia en comparación con genes de anticuerpo de la línea germinal humana a nivel de proteínas.

Composiciones de cadena pesada y ligera de anticuerpos LOX-1 Humaneered™ de FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6, y su porcentaje de similitud a la secuencia de la línea germinal humana más cercana se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Composiciones de Cadena Pesada y Ligera de Anticuerpos LOX-1 y el Porcentaje de Similitud más Cercana a la Secuencia de la Línea Germinal Humana (HC = cadena pesada, LC = cadena ligera)

Fab	HC	HC % Vh1-O2	LC	LC % Vk1-L5
FF1	28+ Probados	90	28Lc	94

FF3	28+ Todos	92	28Lc	94
FF4	28+ Todos	92	21Lc	93
FF5	28+ Todos	92	62lc	90
FF6	28+ Todos	92	62lc	90

Ejemplo 7: Inhibición del Anticuerpo LOX-1 de la Unión de OxLDL a la Proteína LOX-1

La capacidad de anticuerpos LOX-1 para inhibir la unión de oxLDL a la proteína LOX-1 se determinó utilizando el método descrito en el Ejemplo 4. Además de "alta unión a OxLDL" de Kalen Biomédica (número de catálogo 770212-7), que se genera mediante la oxidación de las LDL mediada por sulfato de cobre, otras dos formas de LDL modificado se probaron en este ensayo: LDL modificado de malondialdehido (Academia Bio-Medical Co. número de catálogo 20P-MD-L105) y el LDL modificado de hipoclorito. El hipoclorito de LDL modificado se preparó de acuerdo con el siguiente procedimiento. LDL humana (número de catálogo de Kalen Biomedical 770200-4) se diluyó con PBS hasta una concentración final de 0,25 mg / ml. Después se añadió el hipoclorito de sodio (NaOCl, número de catálogo JT Baker 9416-01) a concentración final de 0.1 mM. La solución se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas, después se inactivó mediante la adición de L-metionina a una concentración final de la reacción mediante la adición de 5 µl de de Mehionina a 100 mM por 200 µl de volumen total. Los datos representativos que muestran la inhibición de la unión de LDL modificado a LOX-1 mediante anticuerpos de LOX-1 se muestran en las Figuras 1A-1C, y se describen en la Tabla 3.

TABLA 3 Inhibición del Anticuerpo LOX-1 de la Unión de OxLDL a la Proteína LOX-1

(tabla con valores IC50)

	LLG783 (FF1)	LLG785 (FF3)	LLG786 (FF4)	LLG787 (FF5)	LLG788 (FF6)	E2E10 (murino precursor)
Inhibición de unión de huLOX-1 a LDL oxidado por sulfato de cobre (IC_{50}, nM)	7	8	8	10	12	6
Inhibición de unión de huLOX-1 a LDL modificada por malon-dialdehído (IC_{50}, nM)	15	14	14	17	18	13
Inhibición de unión de huLOX-1 a LDL modificada por hipoclorito (IC_{50}, nM)	4	3	4	5	5	3
unión de diI-OxLDL a LOX-1 en células (IC50, nM)	5,5	3,3	5,0	4,1	5,9	4,0
Unión de anticuerpos LOX-1 biotinilados a Neutrófilos Humanos	0,15	0,13	0,23	0,08	0,28	0,04

(EC_{50}, □g/mL)						

Ejemplo 8: Inhibición del Anticuerpo LOX-1 de la Unión de OxLDL a las células LOX-1/HK293

Las células huLOX-1/HEK293 se mantuvieron en DMEM que contenía FBS al 10% y penicilina-estreptomicina al 1% como una monocapa adherente en matraces T que contienen 20 ml de medio de cultivo por 75 cm^2 de área de superficie. Las células se incubaron en un incubador humidificado en CO_2 al 5% y 37 º C, y se sub-cultivaron cada 2-3 días. Para el paso de las células, se retira el medio de cultivo, y la monocapa se lava una vez con 10-20 de PBS pre-calentado. Después del lavado, se añade 1 ml de TrypLE Express pre-calentado, y las células se incubaron a 37 º C durante 5 min. A continuación, se añadió medio de cultivo fresco precalentado.

Las células huLOX-1/HEK293 se resuspendieron a $1x10^6$ células / ml y se sembraron 50 □L por pozo en una placa de fondo en V de 96 pozos (5 $x10_4$ células por pozo). Los anticuerpos LOX-1 o de control irrelevantes en medio de ensayo (DMEM + 10% FBS) se añadieron luego a las células. Las concentraciones de anticuerpos finales típicas oscilaron entre 0.006 □g/ml y 20 □g/ml. Las células se incubaron a 37 °C durante 1 hora, después se lavaron dos veces con HBSS caliente. Se añadió Dil-oxLDL (LDL "Altamente Oxidado" marcado con Dil humano, Kalen Biomedical, número de catálogo 770262-9; Dil es perclorato de 1,1 '-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina) en 50 ul de medio de ensayo e agregó después a una concentración final de 30 a 100 □g/mL. Las células se incubaron luego a 37 °C durante 2 horas, y después se lavaron dos veces con buffer BACS (FBS al 2% en PBS). Luego las células se analizaron para intensidad de fluorescencia de Di-I mediante citometría de flujo, tal como se representa en la Figura 2 y la Tabla 3.

Ejemplo 9: Ensayo de Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) Inducidas por OxLDL

Anticuerpos de LOX-1 o anticuerpos de control irrelevantes se incubaron a una concentración final de 2x, ya sea solo o en presencia de un $(Fab)_2$ de entrecruzamiento (Fc $(Fab)_2$ de IgG de cabra anti-humano policlonal, número de catálogo Abcam ab98526)) en 0,05 ml de medio de ensayo (DMEM + 10% de FBS) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. La proporción de $(Fab)_2$ de entrecruzamiento a anticuerpo de LOX-1 se varió e incluía proporciones de 1:1 y 1:2. En los experimentos de respuesta a la dosis con LOX-1 o anticuerpo de control solo (sin agente de entrecruzamiento), se utilizaron concentraciones de anticuerpos que van desde 0,005 □g/ml a 20 □g/ml. En experimentos que comparaban anticuerpo solo a anticuerpo con agente de entrecruzamiento, se utilizaron concentraciones de anticuerpos que van desde 0,03 □g/ml a 20 □g/ml.

Las células que expresan LOX-1 humano (huLOX1/HEK293) se disociaron usando TrypLE Express (número de catálogo de Invitrogen 12605-010) y se lavaron una vez con PBS. Las células se resuspendieron a 2 x 10^6 células / ml en medio de ensayo (DMEM + 10% de FBS) y se sembraron a 50 µl / pozo (1 x 10^5 células / pozo) en una placa con fondo en V de 96 pozos (número de catálogo de Costar 3894). Se agregó 50 µl/pozo de solución de anticuerpo de LOX-1 (o de control) con o sin Fab entrecurzante (preparado como se ha descrito anteriormente) y la mezcla se incubó durante 15 min a 37 ° C. Se agregó oxLDL (0.1 ml/pozo en buffer de ensayo, "oxLDL alto" de Kalen, número de catálogo 770252-7) a una concentración final de 25 µg/ml, y la mezcla resultante se incubó durante 100 min a 37 ° C. H2DCFDA se diluyó en medio de ensayo y 0.1ml/pozo se agregó a una concentración final de 5-10 □M, y la mezcla se incubó durante 15 min a 37 ° C. Las células se lavaron una vez con 200 µl / pozo de HBSS que contiene calcio y magnesio, una vez con 200 µl/pozo de búfer de FACS frío (FBS al 2% en PBS), y las células se resuspendieron en 50-100 µl/ pozo de búfer de FACS frío. La fluorescencia generada como resultado de la oxidación de H2DCFDA se midió usando un citómetro de flujo (excitación: 488 nm, emisión: 500/530 nm). Los resultados ejemplares se muestran en las Figuras 3 y 4, y en la Tabla 4.

Tabla 4

Anticuerpos LOX-1 inhiben la producción de especies reactivas de oxígeno inducida por oxLDL (ROS) en células HEK293 transfectadas con LOX-1 humano (tabla con valores

de IC50), sin evidencia de actividad agonista de LOX-1 (anticuerpo solo o anticuerpo + Fab_2 entrecruzante).

	FF1	FF3	FF4	FF5	FF6	E2E10 (murino precursor)
Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células huLOX-1/HEK293 (IC_{50}, nM)	6,0	7,4	5,3	4,8	7,9	5,7
Agonismo de LOX-1?	No	No	No	No	No	No
Agonismo de LOX-1 (anticuerpo + Fab2 anti-humano en proporción molar 1:2 de Fab2 a anticuerpo)	No	No	No	No	No	No
Agonismo de LOX-1 (anticuerpo + Fab2 anti-humano en proporción molar 1:1 de Fab2 a anticuerpo)	No	No	No	No	No	No

Como se ve en las Figuras 4A-4F, los anticuerpos LOX-1 inhiben las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por oxLDL en la producción células HEK293 transfectadas con LOX-1 humano. En la ausencia de oxLDL, anticuerpos LOX-1 (anticuerpos solos o en la presencia de un Fab^2 de entrecruzamiento) no inducen la producción de ROS. Un anticuerpo de control de isotipo no tiene ningún efecto sobre la producción de ROS inducida por oxLDL en células HEK293 transfectadas con LOX-1 humano.

Ejemplo 10: Anticuerpos LOX-1 se Unen a Neutrófilos Humanos Primarios de LOX-1 Nativo

Los anticuerpos LOX-1 fueron biotiniliados utilizando un kit de Thermo Scientific (Kit de Biotinilación de EZ-Link Micro NHS-PEO4; número de catálogo de Thermo Scientific 21955). Los anticuerpos en búfer de PBS a la concentración de 0,5-1,0 mg / ml se incubaron con un exceso molar de 50 veces de reactivo NHS-biotina a temperatura ambiente durante 60 min. El anticuerpo biotinilado se separó del reactivo de biotinilación en exceso usando una ccolumna de giro desalinizador equilibrada en PBS y se utiliza de acuerdo con las instrucciones del fabricante (columna de giro desalinizador Zeba 7KMWCO, número de catálogo de Thermo Scientific 89882). La concentración del anticuerpo biotinilado se determinó con base en la medición de la absorbancia a 280 nm.

Los neutrófilos se aislaron a partir de muestras de sangre obtenidas de donantes sanos utilizando métodos estándar. Brevemente, la sangre entera humana se recogió en un vial que contiene EDTA. A 10 ml de la muestra de sangre, se agregó 10 ml de Búfer de Sedimentación (dextrano al 3%, cloruro de sodio al 0.9%), y la solución resultante se mezcló suavemente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. La capa superior que comprende plasma rico en leucocitos se centrifugó a 1200 rpm (250-500 x g) durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, y el pellet celular se resuspendió inmediatamente en 10 ml de cloruro de sodio al 0.9% a temperatura ambiente. La suspensión de células resultantes se transfirió cuidadosamente a un tubo cónico de 50 ml que contiene 10 ml de Ficoll-Paque, colocando en capas la suspensión de células en la parte superior de la Ficoll-Paque, y después el tubo se centrifugó a 1.400 rpm (400 x g) durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Luego, la capa superior se descarto. Al pellet celular resultante, se agregó 10 ml de cloruro de sodio al 0,2% enfriado con hielo, y la mezcla se incubó durante exactamente 30 segundos para lisar los eritrocitos; 10 ml de 1,6% de cloruro de sodio enfriada con hielo se añadió a restablecer la isotonicidad. La suspensión celular se centrifugó luego a 1200 rpm (250-500 rpm) durante 5 minutos. A continuación, el sobrenadante se descartó, y el procedimiento de lisis de eritrocitos se repitió una vez más. El pellet celular resultante se resuspendió en búfer de FACS (EDTA 2 mM, BSA al 1%, y azida de sodio al 0,2% en PBS) a una densidad celular de 2 x 10^6 células/ml.

La suspensión de células que contiene neutrófilos humanos recién aislados se transfirió (50ul/pozo) a los pozos de una placa de fondo en V de 96 pozos (1 x 10^5 células/pozo) (Costar, número de catálogo 3894). . Se agregó búfer de bloqueo (suero de conejo normal al 4% diluido en búfer de FACS (EDTA a 2 mM, BSA al 1%, y azida de sodio al 0,2% en PBS) (50 ul / pozo) y la placa se incubó en hielo durante 30 minutos. El anticuerpo de LOX -1 biotinilado (10 ul) en búfer de FACS se agregó después a los pozos a concentraciones finales que varían de 1 ng/ml a 5 ug/ml, y la placa se incubó en hielo durante 30 minutos. Luego la placa se centrifugó a 1200 rpm (250-300 x g) durante 3 minutos y el sobrenadante se descartó Luego, las células se lavaron dos veces con 0.2 ml de búfer FACS, y después se agregó 0.1 ml de PE-straptavidin (BD Pharmingen, número de catálogo 554061) diluido a 1:250 en búfer de FACS , y la placa se incubó en hielo durante 30 minutos. Luego, la placa se centrifugó de nuevo, el sobrenadante desechado, y las células se lavaron dos veces con 0.2 ml de búfer de FACS. Las células se resuspendieron en 0.1 ml de búfer de fijación (búfer FACS con paraformaldehído al 2%) y se analizaron usando un instrumento de FACS. Para determinar un valor de EC50 para la unión de neutrófilos mediante anticuerpos LOX-1, la intensidad de la tinción de LOX-1 determinada mediante FACS se representó gráficamente frente a la concentración del anticuerpo como se muestra en la Figura 5 y en la Tabla 3.

Ejemplo 11: Mapeo de Epítopos mediante Espectrometría de Masas de Intercambio de Hidrógeno / Deuterio

Intercambio de hidrógeno-deuterio (HDx) en combinación con espectrometría de masas (MS) (Woods, 2001) se utilizó para mapear el sitio de unión del anticuerpo E2E10 en LOX-1. En HDx, los hidrógenos de amida intercambiables de proteínas son sustituidos por deuterio. Este proceso es sensible a la estructura/dinámica de la proteína y accesibilidad de disolvente y, por lo tanto, es capaz de informar sobre la unión del ligando. La naturaleza no invasiva de HDxMS, alta sensibilidad, capacidad de trabajar con grandes proteínas, y la alta resolución con la que los sitios de unión se pueden mapear lo diferencian de otros métodos. El objetivo de estos experimentos fue la identificación del epítopo de E2E10 en LOX1.

Experimentos de HDx/MS automatizado se realizaron utilizando métodos similares a los descritos en la literatura (Chalmers, 2006). Un manipulador de líquidos Pal HTS de LEAP Tecnologías (Tecnologías de LEAP, Carrboro, NC) se utilizó para todas las operaciones de manipulación de líquidos. El manipulador de líquido fue controlado mediante secuencias de automatización escritos en LEAP Shell y se encuentra en un entorno refrigerado mantenido a 2 º C. Una válvula de inyección de 6 puertos y una estación de lavado fueron montadas en el equipo manipulador de líquidos y facilitaron la inyección de la muestra en el sistema cromatográfico y el lavado de la jeringa. Para la digestión en línea, una columna de enzima (pepsina inmovilizada de Poroszym , 20 x 2.1 x 30 mm, ABI, Foster City, CA) se colocó en la línea entre la válvula de inyección y un cartucho de retención. El sistema cromatográfico, que consta de dos válvulas adicionales (15kPSI Valco, Houston, TX), un cartucho de retención de fase inversa EXP halo C18 de 4µL (Optimize Technologies Inc., Oregon City, OR), y una columna de analítica (ID 300µm, Halo 2.7 micras C18, Michrom Biorecursos Inc.), se encuentra en un recinto refrigerado por separado que se monta delante de la fuente del espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific, San Jose, CA). La temperatura de la caja de alojamiento del sistema cromatográfico se mantuvo a 0 º C mediante enfriadores de Peltier.

Para los controles no deuterados y deuterados, 10 µl de solución de LOX-1 soluble humana (0.73mg/mL) se diluyó con 15 µl de búfer de trietanolamina a 50 mM (pH 7.8). Los complejos se prepararon mediante la mezcla de 10 µl de solución LOX-1 (0.73mg/mL) con una cantidad equimolar de E2E10 y la cantidad apropiada de búfer de trietanolamina a 50 mM (pH 7,8) para llevar el volumen total a 25 µl. Después de la formación de complejos, las soluciones se dejaron incubar durante 30 min. Para iniciar la reacción de intercambio, 75 µl de búfer de D^2O (D_2O en NaCl a 150 mM, Cambridge Isotopes Laboratories) y se dejó a cambio de 10 min. El pH de la mezcla se redujo con la adición de 0.25 ml de buffer de reducción (urea a 8 M, tiourea a 2 M, TCEP a 0,25 M, pH 2,5) para reducir los enlaces disulfuro y ralentizar la tasa de cambio, congelando efectivamente el estado de intercambio de la muestra. Después de 10 min. de reducción, la mezcla se diluyó con 0.5 ml de búfer de enfriamiento rápido (glicina a 50 mM, pH 2.5). A continuación, 0.5 ml de la muestra se inyectaron a través de una columna de digestión en línea en una trampa, y se analizó por LC-MS como se describe a continuación.

El sistema de cromatografía utiliza dos bombas de HPLC separadas para llevar a cabo la digestión en línea, atrapa los péptidos digeridos en una columna de trampa C18, y eluye péptidos atrapados a través de una columna analítica en el espectrómetro de masas. La bomba de "carga" (bomba Surveyor MS, Thermo Scientific, San Jose, CA), que funciona a una tasa de flujo de 125 µl/min (TFA al 0,05%), transfiere muestras del bucle de muestras de válvula de inyección de PAL (500 µl), a través de columna de pepsina el, y en el cartucho de trampa de fase inversa. Después de un paso de carga de 6 min., una válvula de "carga" se cambió para permitir que búfer (ácido fórmico al 0,25%) de la bomba "gradiente" (Nano Acquity, Waters Corp., Milford, MA) fluyera a través de la trampa a un caudal de 20 µl/min durante un periodo de desalinización de 3 min. Después de la etapa de desalinización, una válvula de "desalinización" se cambió para facilitar la elución de péptidos a partir de la trampa y en sobre la columna analítica y en la fuente de iones del espectrómetro de masas. La bomba gradiente entregada a un gradiente de 0 a 40% de B durante 20 min. seguido de 40% a 75% de B durante 5 min. El tiempo total para el gradiente fue de 30 min. Las composiciones de búfer de bomba gradiente fueron A: 99.75:0.25 %v/v (H_2O: ácido fórmico) y B: 99.75:0.25 %v/v (acetonitrilo: ácido fórmico).

Los péptidos proteolíticos se secuenciaron mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). El mismo método se utilizó para la adquisición de LOX-1 no deuterado, LOX-1 deuterado, y todas las muestras de complejo deuteradas a pesar de que sólo los datos de MS2 de la corrida de LOX1 no deuterado se utilizaron para la identificación de péptidos. Para estas adquisiciones, MS/MS fueron adquiridas en el LTQ y barridos MS fueron adquiridos en el Orbitrap. Adquisiciones en el Orbitrap fueron adquiridas con una resolución de 60.000 en todo el rango m/z de 400-2000. Los parámetros de los instrumentos utilizados para todos los experimentos incluyen un voltaje de pulverización de 3.5kV, un tiempo de inyección máximo de 1.000 ms, objetivo LTQ AGC para MS de 50.000 iones y un objetivo FTMS AGC para MS de 1.000.000 iones. Para iniciar el procesamiento de datos, archivos .RAW Orbitrap se convirtieron en archivos. MzXML (Pedrioli 2004) utilizando un programa interno (RawXtract). Posteriormente, los archivos .mzXML se convirtieron en archivos .mzBIN y adquisiciones MS en tándem se busqcaron utilizando SEQUEST (ThermoElectron). Los resultados SEQUEST fueron filtradas utilizando DTASelect (Tabb 2002). Usando las identificaciones de secuencias peptídicas, se utilizó un programa escrito en el laboratorio (Deutoronomy) para extraer automáticamente cromatogramas para cada ión de secuencia

identificada y generar espectros promedio en un rango de m/z especificado y ventana de tiempo de retención. El promedio de espectros fueron suavizados y centrados para determinar la incorporación media de deuterio. Después del procesaminto de automatizado inicial, la calidad y centroiding de cada espectro promedio se validó o corrigió mediante un visor de datos interactivo integrado en Deutoronomy manualmente.

El experimento de mapeo de HDxMS identificó tres regiones de LOX1 que fueron protegidas de manera significativa. Mayor protección se observó para el péptido F_{228}RVRGAVSQTYPSGTCAYI$_{246}$ (SEQ ID NO:3). También se observó protección menor de los péptidos N_{100}ELKEMIETL$_{109}$ y S_{207}RRNPSYPWLWE$_{218}$ (SEC ID NO: 4 y 5, respectivamente). Las regiones protegidas fueron mapeadas en la estructura cristalina de dominio tipo lectina de extremo C (CTLD) de LOX-1 soluble humano obtenida del banco de datos de proteínas (1YPQ). Una de las regiones protegidas, N_{100}ELKEMIETL$_{109}$ (SEC ID NO.: 4), no está presente en la estructura cristalina del CTLD de LOX-1. El péptido F_{228}RVRGAVSQTYPSGTCAYI$_{246}$ (SEQ ID NO: 3) hace mapeo frontal de la molécula de LOX-1 implicado en la unión de ligando por estudios de mutagénesis dirigida por sitio publicados (Ohki et al. (2005) Estructura, 13: 905-917). Por tanto, los resultados indican que E2E10 probablemente actúa como un inhibidor competitivo de la unión del ligando de LOX-1 a LOX-1. Dado que el proceso de humaneering utilizado para convertir E2E10 a las variantes humanizadas FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6 es muy poco probable que cambie la especificidad de epítopo del anticuerpo (véase el Ejemplo 6), estos resultados también identifican el sitio de unión primario de FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6 en LOX-1.

Cambio en la incorporación de deuterio de péptidos derivados de LOX-1 debido a la unión de E2E10 a LOX-1 se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

Epítopo de LOX-1	SEC ID NO:	Cambio en la incorporación de deuterio
EFRHGLNDIF	124	0
EFRHGLNDIFE	125	0

EAQKIEWHESQVSDL	126	0
AQKIEWHESQVSDL	127	0
LTQEQANLTHQKKKLEGQISARQQAEEASQESENELKE	128	0
LTQEQANLTHQKKKLEGQISARQQAEEASQESENELKEMIETL	129	-2
ASQESENELKEMIETL	130	-1
NELKEMIETL	131	-2
FSSGSFNWEKSQEKC	132	0
FSSGSFNWEKSQEKCLSL	133	0
IQQAISY	134	0
SRRNPSYPWLWEDGSPLMPHL	135	-1
WEDGSPLMPHL	136	0
FRVRGAVSQTYPSGTCAYIQRGAVYAENCILAAFSICQKKANLRAQ	137	-9
YIQRGAVYAEN	138	0
IQRGAVYAEN	139	0
AAFSICQKKANL	140	0
AAFSICQKKANLRAQ	141	0

FSICQKKANL	142	0
FSICQKKANLRAQ	143	0

Ejemplo 12: Preparación de LOX-1 Soluble de Mono Cynomolgus Recombinante Purificada Para Uso en Ensayos de Unión de Anticuerpos de LOX-1

Para determinar las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de LOX-1 de mono cynomolgus, los ARNs totales se extrajeron de los órganos obtenidos a partir de 3 monos individuales: 3 órganos de un individuo de Zyagen/GW, y 12 órganos de 2 individuos de Covance, Inc. Los ARNs totales se utilizaron luego para la amplificación por PCR, utilizando los cebadores de la región no traducida que se han diseñado de acuerdo a las bases de datos públicas (Uniprot, NCBI). Métodos de secuenciación estándar se utilizaron para determinar las secuencias de ácidos nucleicos de los ARNm de LOX-1 amplificados. Dentro del dominio extracelular de LOX-1 de mono cynomolgus (correspondiente a los aminoácidos 61 a 273), las secuencias de aminoácidos de LOX-1 de cynomolgus derivadas de los 3 monos individuales eran idénticos.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular (residuos de aminoácidos 61 a 273) de polipéptido LOX-1 de mono cynomolgus con el péptido señal de extremo N de CD33 humano, etiqueta de purificación (EFHR), y la secuencia de biotinilación BirA (GLNDIFEAQKIEWHE) (SEC ID NO 144) se subclonó en el vector de expresión de células de mamífero pRS5a. Expresión y purificación de LOX-1 soluble de mono cynomolgus se llevó a cabo usando los mismos métodos descritos para el LOX-1 soluble humano en el Ejemplo 1. La secuencia de aminoácidos de LOX-1 de mono cynomolgus soluble en APP-Avi maduro (61-273) se muestra en la Tabla 6. Para algunos experimentos, proteina LOX-1 soluble de mono cynomolgus se biotinilizó usando el mismo método descrito para el LOX-1 soluble humano en el Ejemplo 5.

Tabla 6

SEQ ID 6: Secuencia de aminoácidos de LOX-1 de mono cynomolgus soluble en APP-

Avi maduro (61-273) (etiquetas de APP y Avi subrayadas)
EFRHGLNDIFEAQKIEWHESQVSNLLKQQQTNLTHQKNKLEGQISARQQAEEASQ ESQNELKEMIETLAWKLNEKSKEQMELHHQNLNLQETLKRVANCSAPCPQDWI WHEENCYLFSTGSFNWEKSQEKCLSLDAKLLKINSTADLDFIQQAISYSSFPFWM GLSRRNPSYPWLWEDGSPLMPHLFRIR GAVSQTYPSGTCAYIQRGAVYAENCILAAFSICQKKANLRAQ

Ejemplo 12

Determinación Constante de Disociación de Anticuerpo por Ensayo de unión de Biacore

Para la unión el anticuerpo de LOX-1 murino E2E10 a LOX-1 humano y de mono cynomolgus, una Biacore T200 se cebó con búfer de la corrida fresco y filtrado (1x HBS-EP + (número de catálogo de GE BR-1006-60)). Un chip CM5 (número de catálogo de GE BR-1005-30) se preparó usando un kit de captura de anticuerpos de ratón (número de catálogo de GE BR-1008-38) y un kit de acoplamiento de aminas (número de catálogo de GE BR-1000-50). Brevemente, un nuevo chip se activó con EDC/NHS en 10ul/min durante 420 seg. Anticuerpo de IgG anti-ratón fue inmovilizado a 30ug/ml en acetato a 10 mM de pH 5.0 a 10ul/min de 420 seg. La superficie del chip fue desactivada con solución de etanolamina 1M (10ul/min durante 420 seg) y a continuación se acondicionó tres veces con glicina-HCl a 10 mM, pH 1.5 (número de catálogo de GE BR-1003-54) en 60ul/min durante 30 seg.

Una corrida del método fue programada para medir la cinética de la unión de LOX-1 soluble humano o de mono cynomolgus a anticuerpos anti-LOX-1. 5 ciclos de inicio se llevaron a cabo de la siguiente manera: 1) búfer de corrida durante 30 segundos a 60ul/min, 2) búfer de corrida durante 350 seg con 350 seg de disociación a 60ul/min, lavado adicional con búfer de regeneración (Glicina-HCl, pH 1,5, 0,05% P20 (número de catálogo de GE BR-1000-54)), 3) búfer de regeneración durante 60s en 60ul/min, 4) búfer de regeneración durante 35s en 60ul/min, lavado adicional con búfer de corrida que incluye un control de arrastre.

Para ciclos de muestreo, 1) mAb de LOX-1 Ms-anti-Hu fue capturado en un flujo celular 2, 3, o 4 durante una cantidad predeterminada de tiempo que permitió la captura de aproximadamente 20RUs a 10ul/min. La célula de flujo 1 se utilizó como una referencia, 2) búfer de corridad durante 30 s a 60ul/min, 3) LOX-1 soluble humano o LOX-1 soluble de mono cynomolgus diluido en búfer de corrida a diversas concentraciones (con al menos dos muestras duplicadas y múltiple búfers de diferenciación durante 350 segundos a 60ul/min, ya sea con tiempo de disociación de 750 seg o 3.000 seg), 4) búfer de regeneración durante 60 segundos a 60ul/min, 5) búfer de corrida durante 35s a 60ul/min, lavado adicional con búfer de corrida e incluyendo un control de arrastre. Los datos se analizaron utilizando búfers de diferenciación, diferenciación de referencia, y un modelo de unión 1:1 para ajuste de la curva con el fin de determinar la asociación y constantes de velocidad de disociación (ka y kd) y las constantes de unión en equilibrio (KD) (ver los resultados para E2E10 en las Tablas 7 - 8).

Mediciones de resonancia de plasmón de superficie que cuantifican la interacción de los anticuerpos de LOX-1 humanizado con LOX-1 humano o de mono cynomolgus se realizaron con el biosensor óptico BIAcore T200 en un chip CM5. IgG de cabra anti-h (gamma) (Invitrogen H10500) se revistió a 3000 RU en el chip CM5 en búfer de acetato, pH 4,0. El búfer de corrida utilizado fue PBS, pH 7.4 (filtrado, desgasificado). Anticuerpos de ensayo se cargan en células de flujo individuales a una concentración de 1 ug / ml a una velocidad de flujo de 10 uL / min. El número de destino de la captura de IgG fue entre 20-30 RU, en búfer HBS-EP (HEPES 0.01 M, pH 7.4, NaCl a 0.15 M, EDTA a 3 mM, 0.05% P20). Se diluyó LOX-1 soluble humano o de mono cynomolgus a una concentración de 33 nM en búfer de HBS-EP, después se diluyó en serie (1:3) a una concentración de 0.137 nM. Esto representa seis concentraciones diferentes de LOX-1 humano o de mono cynomolgus. El antígeno se introdujo en flujos celulares individuales a una velocidad de flujo de 30 uL / min. Los parámetros para el tiempo de asociación se establecieron a 700 segundos y el tiempo de disociación se fijó en 5.400 segundos. Los datos se analizaron utilizando búfers de diferenciación , diferenciación de referencia, y un modelo de unión 1:1 para ajuste de la curva con el fin de determinar la asociación y constantes de velocidad de disociación (ka y kd) y las constantes de unión en equilibrio (KD) (ver los resultados para FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6 en las Tablas 7 - 8).

Tabla 7

Constantes de disociación (K^D) de Unión de Anticuerpos de LOX-1 que se unen a LOX-1 Humano Soluble determinada por Ensayos Cinéticos de Unión de Biacore

	FF1	FF3	FF4	FF5	FF6	E2E10 (murino precursor)
k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	$1.0x10^6$	$1.0x10^6$	$2.2x10^6$	$1.1x10^6$	$6.8x10^5$	$1.7x10^6$
k_d (s^{-1})	$1.9x10^{-5}$	$2.0x10^{-5}$	$5.2x10^{-6}$	$3.6x10^{-5}$	$2.3x10^{-5}$	$3.2x10^{-5}$
K_D, pM	19	21	2	34	34	18

Tabla 8

Constantes de disociación (K_D) de Unión de Anticuerpos de LOX-1 a LOX-1 Soluble de Mono Cynomolgus Determinada mediante Ensayos Cinéticos de Unión de Biacore

	FF1	FF3	FF4	FF5	FF6	E2E10 (murino precursor)
k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	$1.1x10^6$	$7.7x10^5$	$2.1x10^6$	$1.4x10^6$	$9.5x10^5$	$1.7x10^6$
k_d (s^{-1})	$1.3x10^{-5}$	$1.7x10^{-5}$	$2.6x10^{-6}$	$4.8x10^{-5}$	$5.0x10^{-5}$	$2.5x10^{-5}$
K_D, pM	12	23	1	35	53	15

Ejemplo 13: Determinación Constante de Disociación de Anticuerpo mediante Ensayo de Titulación de Equilibrio de Solución (SET)

El siguiente protocolo SET se utilizó para determinar el valor KD para la unión de E2E10 biotinilado a LOX-1 soluble humana. Una placa MSD de 96 pozos (placa Standard Bind, número de catálogo de MSD L15XA-3) se recubrió con 50 uL LOX-1 soluble humano a 0.25 ug/ml en PBS mediante incubación durante la noche a 4 ° C. Las muestras en fase de solución se prepararon mediante titulación de LOX-1 soluble humana en el diluyente de SET (PBS, BSA al 0,5%, Tween-20 al 0,1%, Triton X-100 al 0,1%) en una placa de 96 pozos de polipropileno de fondo en V. Esta serie de dilución se combinó 1:1 (100 □L totales) con E2E10 biotinilado diluido en diluyente de SET, y las muestras se incubaron durante la noche a temperatura ambiente con agitación.

La placa MSD recubierta se lavó tres veces con búfer de lavado (PBS, Tween-20 al 0,05%) usando un lavador de placas y luego se invirtió y se transfirió en un Kimwipe para eliminar el líquido residual. A continuación, la placa se bloqueó con 200 uL/pozo de búfer de bloqueo de SET (PBS, BSA al 2%, Tween-20 al 0,1%, Triton X-100 al 0,1%) y se incubaron durante 1 h con agitación suave. La placa se lavó una vez. 25 □L/pozo de la muestra de unión en equilibrio en fase de solución se añadió a la placa, por duplicado, y se incubó durante 30 min con agitación. La placa se lavó tres veces. 25 □ L / pozo de Estreptavidina de SULFO-TAG (número de catálogo de MSD R32AD-1) diluido 1:500 en diluyente de SET se añadió a la placa y se incubó durante 1 hora con agitación suave. La placa se lavó tres veces. 100 □ L de Buffer T de Lectura (número de catálogo de MSD R92TC-1) se añadió a la placa y se leyó en un MSD SECTOR Imager 6000. Los valores de KD se determinaron ajustando los datos a la siguiente ecuación:

Y= (Bmax/(CAb/2))((CAb/2)-((((((CAg+CAb)+KD)/2)-((((((CAg+CAb)+KD)^2)/4)-(CAg*CAb))^0.5))^2)/(2*CAb))),*

donde Bmax es la señal cuando no hay proteína LOX-1 presente en solución, CAb es la concentración constante de anticuerpo de LOX-1 en solución, CAg es la concentración de LOX-1 soluble en solución, y KD es la constante de unión de equilibrio.

Para anticuerpos de LOX-1 humanizados FF1, FF3, FF4, FF5, y FF6, el siguiente protocolo de ensayo de titulación de equilibrio de solución (SET) se utilizó para determinar los valores de K_D. Los ensayos se realizaron en una placa de polipropileno de 96 pozos (Thermo Scientific, no. de catálogo. AB-1127) como sigue. Una concentración constante de anticuerpo de LOX-1 (1 pM) se mezcló con diferentes concentraciones de proteina de LOX-1 no biotinilada humana o de mono cynomolgus (dilución 3 veces en serie que va desde 1 nM a 0.017 pM) en búfer de SET (PBS, pH 7.4 sin $CaCl_2$ o $MgCl_2$, Gibco, no. de catálogo P7949;. albúmina de suero bovino al 0.5% peso/volumen, ácidos grasos libres, Calbiochem, no. de catálogo 26575,. y Tween-20 al 0,02% v / v, Sigma, no. de catálogo P7949). El volumen de reacción final fue de 80 □L. La placa se selló con una película adhesiva (VWR, no. de catálogo. 60941-062) y se incubó a 22 ° C durante 14 horas con agitación constante (300 rpm).

Durante el mismo período, una placa MSD recubierta con estreptavidina de 384 pozos (Meso Scale Discovery, no. de catálogo L21SA) fue bloqueada mediante incubación de la placa con 50 □ l de búfer de bloqueo (PBS, pH 7.4, albumumina de suero bovino al 5% peso/volumen) por pozo durante la noche a 4 ° C. Después la placa MSD bloqueada se lavó 3 veces con búfer de lavado (PBS, pH 7,4 y Tween-20 al 0,05% v / v) usando un lavador de placas (BioTek). Tras el lavado, proteína de LOX-1 soluble humana o de mono cynomolgus biotinilado (25 pM, 15 □L por pozo) se inmovilizó sobre la superficie de incubación a 22 ° C durante una hora con agitación constante (600 rpm). Luego, la placa se lavó 3 veces como se describió anteriomente. En algunos experimentos, proteína de LOX-1 humana soluble no biotinilada se usó (R & D Systems, no. de catálogo 1798-LX-050.); en este caso la proteína LOX-1 se inmovilizó mediante incubación durante la noche a concentración de 1 nM en una placa estándar de MSD (MSD, no. de catálogo L21XA). Las reacciones de unión en equilibrio (15 □L por pozo) se aplicaron luego a la placa MSD con LOX-1 inmovilizado y se incubó durante 30 min. El material no unido se eliminó por lavado de la placa, y el anticuerpo capturado se detectó mediante la adición de 15 □L por pozo de una dilución 1:500 de IgG de cabra anti-humano marcada con Sulfo (Meso Scale Discovery, no. de catálogo R3AJ-1) . La placa se incubó durante una hora con agitación constante (600 rpm). La placa se lavó 3 veces, y luego se agregó 15 □L / pozo de búfer T de lectura MSD 1X (MesoScale Discovery, no. de catálogo R92TC-2) y la placa se desarrolló utilizando un Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery). Los datos se transfirieron a Excel para su análisis y se representaron gráficamente utilizando GraphPad Prism V5. Los valores de K_D se determinaron ajustando los datos a la siguiente ecuación:

Y= (Bmax/(CAb/2))((CAb/2)-((((((CAg+CAb)+KD)/2)-((((((CAg+CAb)+KD)^2)/4)-(CAg*CAb))^0.5))^2)/(2*CAb))),*

donde Bmax es la señal cuando no hay proteína LOX-1 presente en solución, CAb es la concentración constante de anticuerpo de LOX-1 en solución, CAg es la concentración de LOX-1 soluble en solución, y KD es la constante de unión de equilibrio. Resultados para FF1, FF3, FF4, FF5, FF6 y E2E10 se muestran en la Tabla 9 y la Figura 6).

Tabla 9

Determinación de Constantes de Disociación (K_D) de Anticuerpo de LOX-1 Por Ensayos de Titulación de Equilibrio de Solución (SET)

Soluble LOX-1	FF1	FF3	FF4	FF5	FF6	E2E10 (precursor de ratón)
APP-Avi-LOX-1 Soluble Humano (K_D, pM por SET)	1,8	1,6	0,5	0,7	2,3	2
His_9-LOX-1 Soluble Humano De R&D Systems (K_D, pM por SET)	3,1	2,3	0,7	0,8	2,0	ND
APP-Avi-LOX-1 Soluble de Mono Cynomolgus (K_D, pM por SET)	1,8	3,4	0,7	0,6	1,6	ND

Incorporación por referencia Todas las referencias citadas en el presente documento, incluidas las patentes, solicitudes de patente, documentos, libros de texto, y similares, y las referencias citadas en el mismo, se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

Equivalentes La especificación escrita anterior se considera suficiente para permitir a un experto en la técnica poner en práctica la invención. La descripción anterior y los ejemplos detallan ciertas realizaciones preferidas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Se apreciará, sin embargo, que sin importar lo detallado que lo anterior puede aparecer en el texto, la invención puede ponerse en práctica de muchas maneras y la invención debe interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y cualesquiera equivalentes de las mismas.

REIVINDICACIONES:

1. Un anticuerpo anti-LOX-1 aislado o fragmento del mismo.

2. Un anticuerpo anti-LOX-1 aislado o fragmento del mismo que se une al dominio de unión al ligando de LOX-1.

3. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a un epitopo de LOX-1, en donde el epitopo comprende los residuos aminoácidos 100-109, 207-218, o 228-246 de LOX-1.

4. Un anticuerpo aislado o fragmento según cualquier reivindicación anterior, en donde dicho anticuerpo o fragmento bloquea la unión de oxLDL a la proteína LOX-1.

5. Un anticuerpo aislado o fragmento según cualquier reivindicación anterior, en donde dicho anticuerpo o fragmento inhibe la producción inducida por oxLDL de especies reactivas de oxigeno.

6. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a una proteína LOX-1 humano con una Kd inferior o igual a 34 pM, medida por Biacore, o inferior o igual a 4 pM, tal como se mide por el ensayo de valoración con solución de equilibrio (SET).

7. Un anticuerpo aislado o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende al menos una región determinante de complementariedad que tiene una identidad de al menos el 95% con al menos una de las CDRs enumeradas en la Tabla 1.

8. Un anticuerpo aislado o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de la Tabla 1.

9. Un anticuerpo aislado o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una CDR1, CDR2, y CDR3

de la Tabla 1, en la que la variante tiene al menos de uno a cuatro cambios de aminoácidos en una de CDR1, CDR2, o CDR3.

10. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a LOX-1 humano, en el que el anticuerpo o fragmento comprende una CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 10, 30, 50, 70, y 90.

11. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a LOX-1 humano, en el que el anticuerpo o fragmento comprende un VH seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, o 94; y una VL seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 24, 44, 64, 84, o 104 o una secuencia aminoácida con 97-99% de identidad de la misma.

12. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada variable seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74 o 94.

13. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada variable seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 24, 44, 64, 84 o 104.

14. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada variable seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74 o 94; y la secuencia de cadena ligera variable seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 24, 44, 64, 84 o 104.

15. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 8, 28, 48, 68, y 88, CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, y 89; CDR3 seleccionada del grupo que consta de 10, 30, 50, 70, y 90; CDR1 de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 18, 38, 58, 78, y 98, CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, y 99; y CDR3 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, y 100.

16. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 11, 31, 51, 71, y 91, CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 12, 32, 52, 72, y 92; CDR3 seleccionada del grupo que consta de 13, 33, 53, 73, y 93; una CDR1 de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 21, 41, 61, 81, y 101, CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 22, 42, 62, 82, y 102; y CDR3 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 23, 43, 63, 83, y 103.

17. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 8; CDR2 de la SEC ID NO: 9; CDR3 de la SEC ID NO: 10; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 11; CDR2 de la SEC ID NO: 12; y CDR3 de la SEC ID NO: 13.

18. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 28; CDR2 de la SEC ID NO: 29; CDR3 de la SEC ID NO: 30; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 31; CDR2 de la SEC ID NO: 32; y CDR3 de la SEC ID NO: 33.

19. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 48; CDR2 de la SEC ID NO: 49; CDR3 de la SEC ID NO: 50; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 51; CDR2 de la SEC ID NO: 52; y CDR3 de la SEC ID NO: 53.

20. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 68; CDR2 de la SEC ID NO: 69; CDR3 de la SEC ID NO: 70; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 71; CDR2 de la SEC ID NO: 72; y CDR3 de la SEC ID NO: 73.

21. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 88; CDR2 de la SEC ID NO: 89; CDR3 de la SEC ID NO: 90; una CDR1 de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 91; CDR2 de la SEC ID NO: 92; y CDR3 de la SEC ID NO: 93.

22. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

23. Un método de tratamiento de un trastorno relacionado con LOX-1 que comprende administrar a un sujeto afectado con un trastorno LOX-1, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.

24. El método de la reivindicación 23, en el que el sujeto es afectado con una o más entre claudicación intermitente y claudicación de Rutherford Clase II/III.

25. El método de la reivindicación 23, en donde el sujeto es afectado con angina.

26. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une al mismo epítopo que un anticuerpo aislado o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.

27. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a una proteína de LOX-1 humano y compite de manera cruzada con un anticuerpo aislado o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.

Resumen

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen al receptor 1 de LDL (lipoproteína de baja densidad) oxidado similar a lectina humana (en lo sucesivo, denominado a veces como "LOX-1"), y composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento que comprenden los mismos.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
24 December 2014 (24.12.2014)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2014/205300 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2014/043315

(22) International Filing Date:
20 June 2014 (20.06.2014)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/837,776 21 June 2013 (21.06.2013) US

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

(72) Inventors; and

(71) Applicants *(for US only)*: **HELDWEIN, Kurt Alex** [US/US]; 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **SPLAWSKI, Igor** [PL/US]; 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **BROGDON, Jennifer** [US/US]; 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **GOLDSTEIN, Joshua** [US/US]; 10675 John Jay Hopkins Drive, San Diego, California 92121 (US). **DOLE, William** [US/US]; 220 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **TRAUGER, John** [US/US]; 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **ZHANG,**

[Continued on next page]

(54) Title: LECTIN-LIKE OXIDIZED LDL RECEPTOR1 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

(57) Abstract: The present invention relates to monoclonal antibodies binding to human lectin-like oxidized LDL (low density lipoprotein) receptor 1 (hereinafter, sometimes referred to as "LOX-1"), and pharmaceutical compositions and methods of treatment comprising the same.

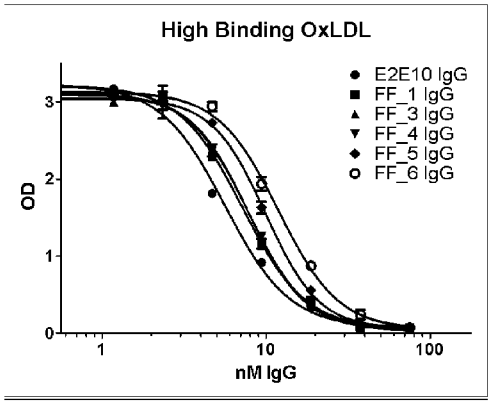


FIG 1A

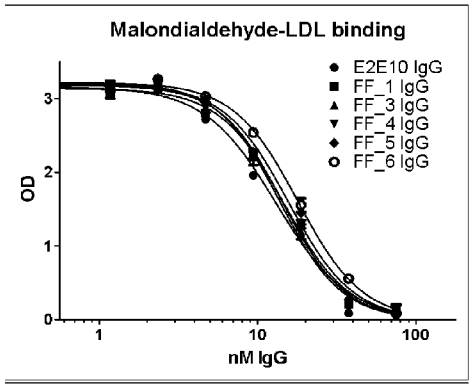


FIG 1B

WO 2014/205300 A2

Chonghui [CN/US]; 300 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US).

(74) **Common Representative**: **NOVARTIS AG**; Lichtstrasse 35, CH-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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

LECTIN-LIKE OXIDIZED LDL RECEPTOR 1 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

BACKGROUND OF THE INVENTION

Vascular disease remains one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. Drugs targeting conventional risk factors lower part of the vascular risk. However, experimental and clinical data suggest that other novel factors may explain the greater part of the risk for coronary, cerebral and peripheral arterial diseases and their clinical manifestations.

Dysregulated uptake of oxidatively modified low density lipoprotein (LDL) particles (oxLDL) by vascular cells mediated by scavenger receptors is considered to be a crucial step in atherogenesis. In addition to mediating the uptake of oxidized lipids, the scavenger receptors can mediate activation of pro-oxidant and pro-inflammatory signaling pathways which are involved in activation of endothelial cells and macrophages, and which lead to progression of atherosclerosis and plaque erosion/rupture as well as to microvascular dysfunction with impaired tissue perfusion and oxygen delivery/utilization, resulting in myocardial or lower limb ischemia.

The lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) is a multifunctional scavenger receptor which is expressed on vascular endothelial cells, monocytes and macrophages, vascular smooth muscle cells, and platelets. LOX-1 binds oxLDL and other oxidized lipids, resulting in activation of NADPH oxidase and generation of reactive oxygen species including superoxide anion. Superoxide anion inactivates endothelial nitric oxide and activates MAP kinase and NF-κB. This in turn induces expression of inflammatory adhesion molecules, cytokines and chemokines, as well as matrix metalloproteinases and pro-apoptotic mediators.

The pro-inflammatory, pro-oxidant and pro-apoptotic consequences of oxLDL – LOX-1 mediated signaling in endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages are thought to play a key role in progression of atherosclerosis and plaque instability and may also play a role in impaired tissue perfusion and oxygen delivery, resulting in ischemia. The clinical consequences of advanced atherosclerosis and organ ischemia include: acute coronary syndromes, myocardial infarction, unstable angina, stroke, angina, claudication and critical limb ischemia. In addition, oxidative stress, vascular

inflammation and resulting microvascular dysfunction are thought to contribute to diabetic vascular disease, including nephropathy and retinopathy.

While basal LOX-1 endothelial expression levels are relatively low under normal physiological conditions, vascular LOX-1 expression is upregulated in conditions associated with vascular disease. Endothelial LOX-1 levels have been shown to be increased by oxidative stress, pro-inflammatory cytokines, C-reactive protein (CRP) and angiotensin II. LOX-1 is also upregulated in the endothelium of atherosclerotic and diabetic animals and in monocytes/macrophages isolated from patients with vascular disease. Hyperglycemia, advanced glycated endproducts and atherogenic lipoproteins also upregulate LOX-1 expression, providing a specific molecular mechanistic link between diabetes and vascular complications.

The upregulation of LOX-1 by cytokines and CRP also suggests a link between conventional vascular risk factors and accelerated vascular disease in high risk patients and diabetics. Both CRP and soluble LOX-1 are elevated in patients with acute coronary syndromes. In vitro data have shown that anti-LOX-1 antibodies prevent CRP mediated monocyte adhesion to human aortic endothelial cells, further supporting a role for LOX-1 as an adhesion molecule relevant to vascular inflammation (Li et al., Circulation Research 2004, 95: 877-883).

Increased expression of LOX-1 coupled to elevated levels of oxLDL and other oxidized lipoproteins induces endothelial dysfunction, in part, by activating NADPH oxidase and generation of reactive oxygen species. Experimentally, oxidant stress induced endothelial dysfunction can be reversed with a neutralizing anti-LOX-1 antibody in ApoE-knockout mice (Xu et al., Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2007, 27:871-877). In this study, anti-LOX-1 antibody increased both bioavailable nitric oxide and eNOS protein expression.

Experimental in vivo data indicate that overexpression of vascular and macrophage LOX-1 in the presence of oxidized lipids contributes to atherosclerosis and microvascular dysfunction by activating pro-oxidant and pro-inflammatory signaling pathways. Thus, inhibition of LOX-1 is expected to prevent development and progression of atherosclerosis and its acute complications such as acute coronary syndromes, myocardial infarction and unstable angina. In addition LOX-1 inhibition is also expected to ameliorate microvascular dysfunction, preventing clinical manifestations of tissue

ischemia such as chronic angina, refractory angina, claudication and critical limb ischemia.

LOX-1 inhibition is useful not only in the treatment and prevention of atherosclerotic vascular disease, but also in treatment of other pathologic conditions characterized by oxidative stress and inflammation such as rheumatoid arthritis, various forms of vasculitis, uveitis, age related macular degeneration, and prevention of cardiovascular events in autoimmune diseases (e.g. lupus erythematosis, psoriasis).

In summary, experimental and clinical data suggest that LOX-1 may be the critical oxidized lipid receptor linking oxidative stress, inflammation and vascular disease. The anti-LOX-1 antibodies and antigen binding fragments described in this invention inhibit binding of oxLDL and other oxidized lipids/lipoproteins to LOX-1, preventing activation of LOX-1, thereby reducing vascular oxidative stress and inflammation. These antibodies are expected to prevent and ameliorate the acute and chronic manifestations of vascular disease and to prevent and ameliorate other diseases characterized by oxidative stress and inflammation.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to monoclonal antibodies binding to human lectin-like oxidized LDL (low density lipoprotein) receptor 1 (hereinafter, sometimes referred to as "LOX-1"), and pharmaceutical compositions and methods of treatment comprising the same.

The isolated anti-LOX-1 antibodies, or antigen binding fragments, described herein bind LOX-1, with an equilibrium dissociation constant (K_D) of less than or equal to 100 pM. For example, the isolated antibodies or antigen binding fragments described herein may bind to human LOX-1 with a K_D of less than or equal to 100 pM, less than or equal to 50 pM, less than or equal to 45 pM, less than or equal to 40 pM, less than or equal to 35 pM. More specifically, the isolated antibodies or antigen binding fragments described herein may also bind human LOX-1 with a K_D of less than or equal to 34 pM, as measured by Biacore, or less than or equal to 4 pM, as measured by solution equilibrium titration assay (SET); and may also bind cynomolgus monkey LOX-1 with a K_D of less than or equal to 53 pM, as measured by Biacore, or less than or equal to 4 pM, as measured by SET.

The present invention relates to an isolated antibody, or antigen binding fragments thereof, that binds to human and cynomolgus monkey LOX-1. The invention also relates to an isolated antibody, or antigen binding fragments thereof, that binds to the LOX-1 C-terminal lectin-like domain (oxLDL binding domain). The invention also relates to an isolated antibody, or antigen binding fragments thereof, that binds an epitope comprising amino acid residues 228-246 from human LOX-1 (FRVRGAVSQTYPSGTCAYI; SEQ ID NO:3). The present invention also includes an isolated antibody, or antigen binding fragments thereof, that binds an epitope on human LOX-1 comprising amino acid residues Arg229 and Arg231 of human LOX-1 (SEQ ID NO:1).

The present invention also relates to an isolated antibody, or antigen binding fragments thereof, that binds LOX-1 and further competes for binding with an antibody as described in Table 1. The present invention also further relates to an isolated antibody, or antigen binding fragments thereof, that binds the same epitope as an antibody as described in Table 1.

The binding affinity of isolated antibodies and antigen binding fragments described herein can be determined by solution equilibrium titration (SET). Methods for SET are known in the art and are described in further detail below. Alternatively, binding affinity of the isolated antibodies, or fragments, described herein can be determined by Biacore assay. Methods for Biacore kinetic assays are know in the art and are described in further detail below.

The isolated anti-LOX-1 antibodies and antigen binding fragments described herein can be used to inhibit LOX-1 binding to oxLDL (also known as modified LDL).

The isolated anti-LOX-1 antibodies and antigen binding fragments described herein can be used to inhibit LOX-1 binding to multiple forms of modified LDL (low density lipoproteins) with an IC_{50} of less than or equal to 100 nM, less than or equal to 50 nM, less than or equal to 35 nM, less than or equal to 25 nM, less than or equal to 10 nM, or less than or equal to 5.2 nM. More specifically, an isolated antibody or antigen binding fragments thereof as described herein can inhibit LOX-1 binding to copper sulfate oxidatively modified LDL (ox-LDLs) with an IC_{50} of less than or equal to 100 nM, less than or equal to 50 nM, less than or equal to 35 nM, less than or equal to 25 nM, less than or equal to 10 nM, or less than or equal to 5.2 nM. More specifically, an isolated antibody or antigen binding fragments thereof as described herein can inhibit LOX-1 binding to malondialdehyde modified LDL with an IC_{50} of less than or equal to 100

nM, less than or equal to 50 nM, less than or equal to 35 nM, less than or equal to 25 nM, less than or equal to 20 nM, or less than or equal to 18 nM. More specifically, an isolated antibody or antigen binding fragments thereof as described herein can inhibit LOX-1 binding to hypochlorite modified LDL with an IC_{50} of less than or equal to 100 nM, less than or equal to 50 nM, less than or equal to 35 nM, less than or equal to 25 nM, less than or equal to 10 nM, or less than or equal to 5 nM.

The isolated anti-LOX-1 antibodies, or antigen binding fragments thereof, may be used to reduce the expression of LOX-1 and/or NADPH oxidase (NADPH is the reduced form of NADP, or nicotinamide adenine dinucleotide phosphate).

The isolated anti-LOX-1 antibodies, or antigen binding fragments thereof, may be used to inhibit (e.g., block the induction of) oxidative stress, e.g., via inhibiting binding of oxLDLs to LOX-1. The isolated anti-LOX-1 antibodies, or antigen binding fragments thereof, may be used to block oxLDL-stimulated reactive oxygen species (ROS) production. Vascular oxidative stress, which the isolated antibodies, or antigen binding fragments thereof, may be used to prevent, treat, or ameliorate, causes myocardial ischemia by inducing vasoconstriction, impairing vasodilation, and increasing oxygen demand.

The isolated anti-LOX-1 antibodies, or antigen binding fragments thereof, may be used to restore endothelial nitric oxide synthase (eNOS) levels to a healthy, homeostatic state. Endothelial NOS is a nitric oxide synthase that generates nitric oxide (NO) in blood vessels and is involved in regulating vascular tone by inhibiting smooth muscle contraction and platelet aggregation; its downregulation is associated with LOX-1-related endothelial cell dysfunction.

The isolated anti-LOX-1 antibodies, or antigen binding fragments thereof, as described herein can be monoclonal antibodies, human or humanized antibodies, chimeric antibodies, single chain antibodies, Fab fragments, Fv fragments, F(ab')2 fragments, or scFv fragments, and/or IgG isotypes.

The isolated anti-LOX-1 antibodies, or antigen binding fragments thereof, as described herein can also include a framework in which an amino acid has been substituted into the antibody framework from the respective human VH or VL germline sequences.

Another aspect of the invention includes an isolated antibody or antigen binding fragments thereof having the full heavy and light chain sequences of Fabs described in

Table 1. More specifically, the isolated antibody or antigen binding fragments thereof can have the heavy and light chain sequences of Fab FF1, FF3, FF4, FF5, and FF6.

A further aspect of the invention includes an isolated antibody or antigen binding fragments thereof having the heavy and light chain variable domain sequences of Fabs described in Table 1. More specifically, the isolated antibody or antigen binding fragment thereof can have the heavy and light chain variable domain sequence of Fab FF1, FF3, FF4, FF5, and FF6.

The invention also relates to an isolated antibody or antigen binding fragments thereof that includes a heavy chain CDR1 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, and 88; a heavy chain CDR2 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, and 89; and a heavy chain CDR3 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10, 30, 50, 70, and 90, wherein the isolated antibody or antigen binding fragments thereof binds to human LOX-1. In another aspect, such isolated antibody or antigen binding fragments thereof further includes a light chain CDR1 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 18, 38, 58, 78, and 98; a light chain CDR2 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, and 99; and a light chain CDR3 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, and 100.

The invention also relates to an isolated antibody or antigen binding fragments thereof that includes a light chain CDR1 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 18, 38, 58, 78, and 98; a light chain CDR2 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, and 99; and a light chain CDR3 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, and 100, wherein the isolated antibody or antigen binding fragments thereof binds to human LOX-1.

The invention also relates to an isolated antibody or antigen binding fragments thereof that binds LOX-1 having HCDR1, HCDR2, and HCDR3 and LCDR1, LCDR2, and LCDR3, wherein HCDR1, HCDR2, and HCDR3 comprises SEQ ID NOs: 8, 9, and 10, and LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprises SEQ ID NOs: 18, 19, and 20; or HCDR1, HCDR2, and HCDR3 comprises SEQ ID NOs: 28, 29, and 30, and LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprises SEQ ID NOs: 38, 39, and 40; or HCDR1, HCDR2, and HCDR3 comprises SEQ ID NOs: 48, 49, and 50, and LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprises SEQ ID NOs: 58, 59, and 60; or HCDR1, HCDR2, and HCDR3 comprises SEQ ID NOs: 68, 69, and 70, and LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprises SEQ ID NOs: 78, 79, and 80; or

HCDR1, HCDR2, and HCDR3 comprises SEQ ID NOs: 88, 89, and 90, and LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprises SEQ ID NOs: 98, 99, and 100.

The invention also relates to an antibody or antigen binding fragment having HCDR1, HCDR2, and HCDR3 of the variable heavy chain of SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74, or 94, and the LCDR1, LCDR2 and LCDR3 of the variable light chain of SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, or 104, as defined by Chothia. In another aspect of the invention the antibody or antigen binding fragment may have the HCDR1, HCDR2, and HCDR3 of the heavy chain variable domain sequence of SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74, or 94, and the LCDR1, LCDR2 and LCDR3 of the light chain variable domain sequence of SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, or 104, as defined by Kabat.

In one aspect of the invention the isolated antibody or antigen binding fragments thereof includes a heavy chain variable domain sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74, and 94. The isolated antibody or antigen binding fragment further can comprise a light chain variable domain sequence wherein the heavy chain variable domain and light chain variable domain combine to form and antigen binding site for LOX-1. In particular the light chain variable domain sequence can be selected from SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, and 104 wherein said isolated antibody or antigen binding fragments thereof binds LOX-1.

The invention also relates to an isolated antibody or antigen binding fragments thereof that includes a light chain variable domain sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, and 104, wherein said isolated antibody or antigen binding fragments thereof binds to human LOX-1. The isolated antibody or antigen binding fragment may further comprise a heavy chain variable domain sequence wherein the light chain variable domain and heavy chain variable domain combine to form and antigen binding site for LOX-1.

In particular, the isolated antibody or antigen binding fragments thereof that binds LOX-1, may have heavy and light chain variable domains comprising the sequences of SEQ ID NOs: 14 and 24; 34 and 44; 54 and 64; 74 and 84; or 94 and 104, respectively.

The invention further relates to an isolated antibody or antigen binding fragments thereof, that includes a heavy chain variable domain having at least 90% sequence identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74, and 94, wherein said antibody binds to LOX-1. In one aspect, the isolated antibody or antigen binding fragments thereof also includes a light chain variable domain having at least 90% sequence identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID

NOs: 24, 44, 64, 84, and 104. In a further aspect of the invention, the isolated antibody or antigen binding fragment has an HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 and LCDR3 as defined by Kabat and as described in Table 1.

The invention also relates to an isolated antibody or antigen binding fragments thereof, having a light chain variable domain having at least 90% sequence identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, and 104, wherein said antibody binds LOX-1.

In another aspect of the invention, the isolated antibody, or antigen binding fragments thereof, that binds to LOX-1 may have a heavy chain comprising the sequence of SEQ ID NOs: 16, 36, 56, 76, or 96. The isolated antibody can also includes a light chain that can combine with the heavy chain to form an antigen binding site to human LOX-1. In particular, the light chain may have a sequence comprising SEQ ID NOs: 26, 46, 66, 86, or 106. In particular, the isolated antibody or antigen binding fragments thereof that binds LOX-1, may have a heavy chain and a light chain comprising the sequences of SEQ ID NOs: 16 and 26; 36 and 46; 56 and 66; 76 and 86; or 96 and 106, respectively.

The invention still further relates to an isolated antibody or antigen binding fragments thereof that includes a heavy chain having at least 90% sequence identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 16, 36, 56, 76, or 96, wherein said antibody binds to LOX-1. In one aspect, the isolated antibody or antigen binding fragments thereof also includes a light chain having at least 90% sequence identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 26, 46, 66, 86, or 106.

The invention still further relates to an isolated antibody or antigen binding fragments thereof that includes a light chain having at least 90% sequence identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 26, 46, 66, 86, or 106, wherein said antibody binds LOX-1.

The invention also relates to compositions comprising the isolated antibody, or antigen binding fragments thereof, described herein. As well as, antibody compositions in combination with a pharmaceutically acceptable carrier. Specifically, the invention further includes pharmaceutical compositions comprising an antibody or antigen binding fragments thereof of Table 1, such as, for example antibody FF1, FF3, FF4, FF5, and FF6. The invention also relates to pharmaceutical compositions comprising a

combination of two or more of the isolated antibodies or antigen binding fragments thereof of Table 1.

The invention also relates to an isolated nucleic acid sequence encoding the variable heavy chain having a sequence selected from SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74, and 94. In particular the nucleic acid has a sequence at least 90% sequence identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 15, 35, 55, 75, and 95. In a further aspect of the invention the sequence is SEQ ID NOs: 15, 35, 55, 75, and 95.

The invention also relates to an isolated nucleic acid sequence encoding the variable light chain having a sequence selected from SEQ ID NOs: 25, 45, 65, 85, and 105. In particular the nucleic acid has a sequence at least 90% sequence identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 25, 45, 65, 85, and 105. In a further aspect of the invention the sequence is SEQ ID NOs: 25, 45, 65, 85, and 105.

The invention also relates to an isolated nucleic acid comprising a sequence encoding a polypeptide that includes a light chain variable domain having at least 90% sequence identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 25, 45, 65, 85, and 105.

The invention also relates to a vector that includes one or more of the nucleic acid molecules described herein.

The invention also relates to an isolated host cell that includes a recombinant DNA sequence encoding a heavy chain of the antibody described above, and a second recombinant DNA sequence encoding a light chain of the antibody described above, wherein said DNA sequences are operably linked to a promoter and are capable of being expressed in the host cell. It is contemplated that the antibody can be a human monoclonal antibody. It is also contemplated that the host cell is a non-human mammalian cell.

The invention also relates to a method of reducing LOX-1 expression, and/or NADPH oxidase expression, wherein the method includes the step of contacting a cell with an effective amount of a composition comprising the isolated antibody or antigen binding fragments thereof described herein.

The invention also relates to a method of inhibiting the binding of oxidized LDL (oxLDL) to a human oxidized LDL receptor (LOX-1) or to inhibit the human oxidized LDL

receptor-mediated incorporation of oxidized LDL into cells, wherein the method includes the step of contacting a cell with an effective amount of a composition comprising the isolated antibody or antigen binding fragments thereof described herein.

It is contemplated that the cell is a human cell. It is further contemplated that the cell is in a subject. In one embodiment, it is contemplated that the cell is an endothelial cell. In other embodiments, the cell may be one or more of macrophages, monocytes, dendritic cells, vascular smooth muscle cells (SMC), chondrocytes, and cardiac myocytes. It is still further contemplated that the subject is human.

The invention also relates to a method of treating, improving, or preventing a LOX-1-associated disorder in a subject, wherein the method includes the step of administering to the subject an effective amount of a composition comprising the antibody or antigen binding fragments thereof described herein. In one aspect, the LOX-1-associated disorder is associated with claudication (e.g., intermittent claudication, Rutherford Class II/III Claudication). In one aspect, the LOX-1-associated disorder is associated with angina (e.g., refractory angina). It is contemplated that the subject is human.

Any of the foregoing isolated antibodies or antigen binding fragments thereof may be a monoclonal antibody or antigen binding fragments thereof.

DEFINITIONS

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by those of ordinary skill in the art to which this invention pertains.

The term “LOX-1 protein” or “LOX-1 antigen” or “LOX-1” or “Lox1” are used interchangeably, and refers to the Lectin-Like Oxidized LDL Receptor1 (LOX-1) protein in different species. For example, human LOX-1 has the sequence as set out in Table 1 (SEQ ID NO:1), and has been described in previous reports and literature (Nature, Vol. 386, p. 73-77, 1997; Genomics, Vol. 54, No. 2, p. 191-199, 1998; Biochem. J., Vol. 339, Part 1, P. 177-184, 1999; Genbank Accession No. NP 002534). It is a class E scavenger receptor that mediates the uptake of oxLDL by vascular cells and oxLDL signaling in vascular cells, and as such, is a mediator of the toxic effects of oxLDL. LOX-

1 is expressed on the surface of vascular endothelial cells and has been implicated in the accumulation of monocytes and macrophages on vascular endothelial cells.

In addition, in the context of this invention, the term "LOX-1" includes mutants of the natural human oxidized-LDL receptor, which have substantially the same amino acid sequence as that of the native primary structure (amino acid sequence) described in the above-mentioned reports. Herein, the term "mutants of the natural human oxidized-LDL receptor having substantially the same amino acid sequence" refers to such mutant proteins.

Multiple forms of modified LDL formed *in vitro* and/or *in vivo* have been shown to bind to LOX-1. As used herein, the term "modified LDL" and "oxidized LDL" (and "oxLDL") are used interchangeably to describe low density lipoproteins which are oxidized by cells, such as vascular endothelial cells, in combination with various chemical and physical factors (e.g., heat). LDL is oxidized, for example, within the vascular wall under atherogenic conditions to form oxLDL. The term "modified LDL" can encompass the following: oxidized LDL, copper sulfate oxidatively modified LDL, acetyl LDL, chlorinated LDL (e.g., LDL modified via a chemical chlorination reaction), myeloperoxidase modified LDL, hypochlorite modified LDL, succinyl LDL, and malondialdehyde modified LDL (i.e., LDL modified via reaction with malondialdehyde, which is produced in vivo as a consequence of oxidative stress).

The term "antibody" as used herein means a whole antibody and any antigen binding fragment (*i.e.*, "antigen-binding portion") or single chain thereof. A whole 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 VH) 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 VL) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The VH and VL 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 VH and VL 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 (Clq) of the classical complement system.

The term "antigen binding portion" or "antigen binding fragment" 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.*, human oxidized LDL receptor (LOX-1)). 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 or antigen binding fragment of an antibody include a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the VL, VH, CL and CH1 domains; a $F(ab)_2$ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; an Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; an Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody; a single domain antibody (dAb) fragment (Ward *et al.*, 1989 Nature 341:544-546), which consists of a VH domain or a VL domain; and an isolated complementarity determining region (CDR).

Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, VL and VH, 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 VL and VH 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 or fragments 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 fragments 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 fragments can be incorporated into single chain molecules comprising a pair of tandem Fv segments (VH-CH1-VH-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).

As used herein, the term "affinity" refers to the strength of interaction between antibody and antigen at single antigenic sites. Within each antigenic site, the variable region of the antibody "arm" interacts through weak non-covalent forces with antigen at numerous sites; the more interactions, the stronger the affinity. As used herein, the term "high affinity" for an antibody or antigen binding fragments thereof (e.g., a Fab fragment) generally refers to an antibody, or antigen binding fragment, having a KD of 10^{-9}M or less.

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

The term "binding specificity" as used herein refers to the ability of an individual antibody combining site to react with only one antigenic determinant.

The phrase "specifically (or selectively) binds" to an antibody (*e.g.*, a LOX-1-binding antibody) refers to a binding reaction that is determinative of the presence of a cognate antigen (*e.g.*, a human LOX-1 or cynomolgus LOX-1) in a heterogeneous population of proteins and other biologics. The phrases "an antibody recognizing an antigen" and "an antibody specific for an antigen" are used interchangeably herein with the term "an antibody which binds specifically to an antigen".

The term "LOX-1 mediated" refers to the fact that the LOX-1 receptor mediates the cellular response upon binding of a LOX-1 ligand, e.g., oxLDL, to LOX-1 on the cell surface, which then triggers the cell to increase production of certain pro-inflammatory molecules. The term "pro-inflammatory gene" refers to a gene encoding any molecule, such as, but not limited to, a cytokine, a chemokine, or a cell-adhesion molecule, which plays a role in an inflammatory process. Exemplary "pro-inflammatory" genes include,

but are not limited to, interleukin-8 (IL-8), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1).

A "LOX-1-associated disorder," "LOX-1-associated condition," "disease or condition associated with elevated levels of LOX-1," or similar terms as used herein, refer to any number of conditions or diseases in which the LOX-1 protein levels are aberrantly high and/or in which a reduction of LOX-1 protein levels is sought. These conditions include but are not limited to cardiovascular disorders, endothelial cell dysfunction, endothelial cell disorders, atherosclerosis, arteriosclerosis, hypertension, hyperlipidemia, hypercholesterolemia, diabetes mellitus, nitric oxide deficiency, myocardial infarction, vascular oxidative stress, myocardial ischemia, ischemia-reperfusion, sepsis, diabetic nephropathy, renal disease, cardiomyopathy, heart failure, peripheral artery disease, coronary heart disease, claudication (e.g., intermittent claudication, Rutherford Class II/III Claudication), peripheral artery disease (PAD), angina (e.g., refractory angina), coronary artery disease (CAD) (e.g., due to atherosclerosis of the arteries feeding the heart), stroke, and abnormal endothelium-dependent vasodilation.

"Endothelial cell dysfunction," as used herein, means the inability of an endothelial cell to maintain its normal function. The endothelium plays a critcal role in regulating vascular smooth tone and growth, vascular permeability, the inflammatory response, coagulation, and platelet adhesion. Non-limiting examples of endothelial cell function include maintaining balanced vascular tone, inhibiting thrombosis, inhibiting pro-inflammatory processes, maintaining vascular integrity (e.g., non-leakiness of the vasculature), and maintaining an anti-proliferative state in both the endothelium and smooth muscle cells. Common conditions and risk factors predisposing to atherosclerosis, such as dyslipidemia, hypertension, diabetes, and smoking are all associated with endothelial dysfunction, which promotes the development, progression, and complications of atherosclerosis. Endothelial dysfunction has generally been assessed as impaired endothelium-dependent vasodilation. This assumes that endothelium-dependent vasodilation is a surrogate marker for other important endothelial functions. The basis for this assumption is the observation that endothelium-derived nitric oxide, synthesized by the endothelial NO synthase (eNOS) from L-arginine, mediates endothelium-dependent vasodilation and other endothelial vasculoprotective functions. A growing clinical database suggests that endothelial dysfunction (impaired endothelial dependent vasodilation) is closely associated with major adverse

cardiovascular events including myocardial ischemia and infarction, acute coronary syndromes, claudication and critical limb ischemia, transient ischemic attacks and stroke.

Accumulating experimental data also suggests that endothelial and endocadial impaired eNOS-derived NO availability not only may lead to abnormal left ventricular remodeling and dysfunction contributing to development and progression of heart failure.

An "endothelial cell disorder," as used herein, is any disorder that is characterized by endothelial cell dysfunction. Non-limiting examples of diseases or disorders that are characterized by endothelial cell dysfunction include angiogenic disorders such as cancers which require neovascularization to support tumor growth, infectious diseases, autoimmune disorders, vascular malformations, DiGeorge syndrome, HHT, cavernous hemangioma, transplant arteriopathy, vascular access stenosis associated with hemodialysis, vasculitis, vasculitidis, vascular inflammatory disorders, atherosclerosis, obesity, psoriasis, warts, allergic dermatitis, scar keloids, pyogenic granulomas, blistering disease, Kaposi sarcoma, persistent hyperplastic vitreous syndrome, retinopathy of prematurity, choroidal neovascularization, macular degeneration, diabetic retinopathy, ocular neovascularization, primary pulmonary hypertension, asthma, nasal polyps, inflammatory bowel and periodontal disease, ascites, peritoneal adhesions, contraception, endometriosis, uterine bleeding, ovarian cysts, ovarian hyperstimulation, arthritis, rheumatoid arthritis, chronic articular rheumatism, synovitis, osteoarthritis, osteomyelitis, osteophyte formation, sepsis, and vascular leak. Endothelial cell dysfunction can be determined using assays known in the art including detecting the increased expression of endothelial adhesion molecules or decreased expression or biological activity of nitric oxide synthase (eNOS).

"Claudication," as used herein, includes severe claudication and other like terms, and describes a mobility impairment and high unmet medical need. Claudication is a condition characterized by lower extremity ischemia, causing muscle fatigue, pain on exertion relieved by rest, limited mobility, and reduced quality of life, and is caused by atherosclerosis and abnormal (e.g., impaired) endothelium-dependent vasodilation. Its prevalence in the US is 8-12 million patients. Among patients with intermittent claudication, 7% will undergo lower extremity bypass surgery, 4% will require major amputations, and 16% will develop worsening claudication. Cardiovascular events, such as myocardial infarction and stroke, occur in 20% of severe claudication sufferers over 5 years. The current therapy is surgical, and treatment through less invasive means, such as the administration of the anti-LOX-1 antibodies of the invention, would represent an enormous therapeutic breakthrough.

"Refractory angina," as used herein, is a condition marked by chest pain due to ischemia of the heart muscle, generally due to obstruction or spasm of the coronary arteries (e.g., from coronary artery disease), with debilitating symptoms, very limited physical activity and poor quality of life. The 1-1.8 million patients refractory angina sufferers in the US experience increased cardiovascular mortality at a rate of 10% per year; at least 100,000 new refractory angina cases arise per year.

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

The term "conservatively modified variant" applies to both amino acid and nucleic acid sequences. With respect to particular nucleic acid sequences, conservatively modified variants refers to those nucleic acids which encode identical or essentially identical amino acid sequences, or where the nucleic acid does not encode an amino acid sequence, to essentially identical sequences. Because of the degeneracy of the genetic code, a large number of functionally identical nucleic acids encode any given protein. For instance, the codons GCA, GCC, GCG and GCU all encode the amino acid alanine. Thus, at every position where an alanine is specified by a codon, the codon can be altered to any of the corresponding codons described without altering the encoded polypeptide. Such nucleic acid variations are "silent variations," which are one species of conservatively modified variations. Every nucleic acid sequence herein which encodes a polypeptide also describes every possible silent variation of the nucleic acid. One of skill will recognize that each codon in a nucleic acid (except AUG, which is ordinarily the only codon for methionine, and TGG, which is ordinarily the only codon for tryptophan) can be modified to yield a functionally identical molecule. Accordingly, each silent variation of a nucleic acid that encodes a polypeptide is implicit in each described sequence.

For polypeptide sequences, "conservatively modified variants" include individual substitutions, deletions or additions to a polypeptide sequence which result in the substitution of an amino acid with a chemically similar amino acid. Conservative substitution tables providing functionally similar amino acids are well known in the art. Such conservatively modified variants are in addition to and do not exclude polymorphic variants, interspecies homologs, and alleles of the invention. The following eight groups contain amino acids that are conservative substitutions for one another: 1) Alanine (A), Glycine (G); 2) Aspartic acid (D), Glutamic acid (E); 3) Asparagine (N), Glutamine (Q); 4) Arginine (R), Lysine (K); 5) Isoleucine (I), Leucine (L), Methionine (M), Valine (V); 6) Phenylalanine (F), Tyrosine (Y), Tryptophan (W); 7) Serine (S), Threonine (T); and 8) Cysteine (C), Methionine (M) (see, *e.g.*, Creighton, Proteins (1984)). In some embodiments, the term "conservative sequence modifications" are used to refer to amino acid modifications that do not significantly affect or alter the binding characteristics of the antibody containing the amino acid sequence.

The term "epitope" means a protein determinant capable of specific binding to an antibody. Epitopes usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and usually have specific three dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics. Conformational and nonconformational epitopes are distinguished in that the binding to the former but not the latter is lost in the presence of denaturing solvents.

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*).

The term "human monoclonal antibody" refers to antibodies displaying a single binding specificity which have variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from human sequences. In one embodiment, the human monoclonal antibodies are produced by a hybridoma which 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.

A "humanized" antibody is an antibody that retains the reactivity of a non-human antibody while being less immunogenic in humans. This can be achieved, for instance, by retaining the non-human CDR regions and replacing the remaining parts of the antibody with their human counterparts (*i.e.*, the constant region as well as the framework portions of the variable region). See, *e.g.*, Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92, 1988; Verhoeyen *et al.*, Science, 239:1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991; and Padlan, Molec. Immun., 31:169-217, 1994. Other examples of human engineering technology include, but are not limited to Xoma technology disclosed in US 5,766,886.

The terms "identical" or percent "identity," in the context of two or more nucleic acids or polypeptide sequences, refer to two or more sequences or subsequences that are the same. Two sequences are "substantially identical" if two sequences have a specified percentage of amino acid residues or nucleotides that are the same (*i.e.*, 60% identity, optionally 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, or 99% identity over a specified region, or, when not specified, over the entire sequence), when compared and aligned for maximum correspondence over a comparison window, or designated region as measured using one of the following sequence comparison algorithms or by manual alignment and visual inspection. Optionally, the identity exists over a region that is at least about 50 nucleotides (or 10 amino acids) in length, or more preferably over a region that is 100 to 500 or 1000 or more nucleotides (or 20, 50, 200 or more amino acids) in length.

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

A "comparison window", as used herein, includes reference to a segment of any one of the number of contiguous positions selected from the group consisting of from 20 to 600, usually about 50 to about 200, more usually about 100 to about 150 in which a sequence may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned. Methods of alignment of

sequences for comparison are well known in the art. Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, *e.g.*, by the local homology algorithm of Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, by the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, by the search for similarity method of Pearson and Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by manual alignment and visual inspection (see, *e.g.*, Brent *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou ed., 2003)).

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

The BLAST algorithm also performs a statistical analysis of the similarity between two sequences (see, *e.g.*, Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993). One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability (P(N)), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a nucleic acid is considered similar to a reference sequence if the smallest sum probability in a comparison of the test nucleic acid to the reference nucleic acid is less than about 0.2, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

The percent identity between two amino acid sequences can also be determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988) 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. In addition, the percent identity between two amino acid sequences can be determined using the Needleman and Wunsch (J. Mol, Biol. 48:444-453, 1970) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available on the world wide web at gcg.com), using either a Blossom 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

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

The term “isolated antibody” refers to an antibody that is substantially free of other antibodies having different antigenic specificities (*e.g.*, an isolated antibody that specifically binds LOX-1 is substantially free of antibodies that specifically bind antigens other than LOX-1). An isolated antibody that specifically binds LOX-1 may, however, have cross-reactivity to other antigens. Moreover, an isolated antibody may be substantially free of other cellular material and/or chemicals.

The term "isotype" refers to the antibody class (*e.g.*, IgM, IgE, IgG such as IgG1 or IgG4) that is provided by the heavy chain constant region genes. Isotype also includes modified versions of one of these classes, where modifications have been made to alter the Fc function, for example, to enhance or reduce effector functions or binding to Fc receptors.

The term "k_{assoc}" or "k_a", as used herein, is intended to refer to the association rate of a particular antibody-antigen interaction, whereas the term "k_{dis}" or "k_d," as used herein, is intended to refer to the dissociation rate of a particular antibody-antigen interaction. The term "K_D", as used herein, is intended to refer to the dissociation constant, which is obtained from the ratio of k_d to k_a (*i.e.* k_d/k_a) and is expressed as a molar concentration (M). K_D values for antibodies can be determined using methods well established in the art. Methods for determining the K_D of an antibody include measuring surface plasmon resonance using a biosensor system such as a Biacore® system, or measuring affinity in solution by solution equilibrium titration (SET).

The terms "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition" as used herein refer 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 "nucleic acid" is used herein interchangeably with the term "polynucleotide" and refers to deoxyribonucleotides or ribonucleotides and polymers thereof in either single- or double-stranded form. The term encompasses nucleic acids containing known nucleotide analogs or modified backbone residues or linkages, which are synthetic, naturally occurring, and non-naturally occurring, which have similar binding properties as the reference nucleic acid, and which are metabolized in a manner similar to the reference nucleotides. Examples of such analogs include, without limitation, phosphorothioates, phosphoramidates, methyl phosphonates, chiral-methyl phosphonates, 2-O-methyl ribonucleotides, peptide-nucleic acids (PNAs).

Unless otherwise indicated, a particular nucleic acid sequence also implicitly encompasses conservatively modified variants thereof (*e.g.*, degenerate codon substitutions) and complementary sequences, as well as the sequence explicitly indicated. Specifically, as detailed below, degenerate codon substitutions may be achieved by generating sequences in which the third position of one or more selected (or all) codons is substituted with mixed-base and/or deoxyinosine residues (Batzer *et al.*,

Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985; and Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994).

The term "operably linked" refers to a functional relationship between two or more polynucleotide (*e.g.*, DNA) segments. Typically, the term refers to the functional relationship of a transcriptional regulatory sequence to a transcribed sequence. For example, a promoter or enhancer sequence is operably linked to a coding sequence if it stimulates or modulates the transcription of the coding sequence in an appropriate host cell or other expression system. Generally, promoter transcriptional regulatory sequences that are operably linked to a transcribed sequence are physically contiguous to the transcribed sequence, *i.e.*, they are cis-acting. However, some transcriptional regulatory sequences, such as enhancers, need not be physically contiguous or located in close proximity to the coding sequences whose transcription they enhance.

As used herein, the term, "optimized" means that a nucleotide sequence 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 Pichia, a Chinese Hamster Ovary cell (CHO) or a human cell. The optimized nucleotide sequence is engineered to retain completely or as much as possible the amino acid sequence originally encoded by the starting nucleotide sequence, which is also known as the "parental" sequence. The optimized sequences herein have been engineered to have codons that are preferred in mammalian cells. However, optimized expression of these sequences in other eukaryotic cells or prokaryotic cells is also envisioned herein. The amino acid sequences encoded by optimized nucleotide sequences are also referred to as optimized.

The terms "polypeptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an artificial chemical mimetic of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers and non-naturally occurring amino acid polymer. Unless otherwise indicated, a particular polypeptide sequence also implicitly encompasses conservatively modified variants thereof.

The term "recombinant human antibody", as used herein, includes all human antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as antibodies isolated from an animal (*e.g.*, a mouse) that is transgenic or transchromosomal for human immunoglobulin genes or a hybridoma prepared therefrom,

antibodies isolated from a host cell transformed to express the human antibody, *e.g.*, from a transfectoma, antibodies isolated from a recombinant, combinatorial human antibody library, and antibodies prepared, expressed, created or isolated by any other means that involve splicing of all or a portion of a human immunoglobulin gene, sequences to other DNA sequences. Such recombinant human antibodies have variable regions in which the framework and CDR regions are 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 VH and VL regions of the recombinant antibodies are sequences that, while derived from and related to human germline VH and VL sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire *in vivo*.

The term "recombinant host cell" (or simply "host cell") refers to a cell into which a recombinant expression vector has been introduced. It should be understood that such terms are intended to refer not only to the particular subject cell but to the progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term "host cell" as used herein.

The term "subject" includes human and non-human animals. Non-human animals include all vertebrates (e.g.: mammals and non-mammals) such as, non-human primates (e.g.: cynomolgus monkey), sheep, dog, cow, chickens, amphibians, and reptiles. Except when noted, the terms "patient" or "subject" are used herein interchangeably. As used herein, the terms "cyno" or "cynomolgus" refer to the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*).

As used herein, the term "treating" or "treatment" of any disease or disorder (e.g., LOX-1 associated disorder) refers in one embodiment, to ameliorating the disease or disorder (i.e., slowing or arresting or reducing the development of the disease or at least one of the clinical symptoms thereof). In another embodiment "treating" or "treatment" refers to alleviating or ameliorating at least one physical parameter including those which may not be discernible by the patient. In yet another embodiment, "treating" or "treatment" refers to modulating the disease or disorder, either physically, (*e.g.*, stabilization of a discernible symptom), physiologically, (*e.g.*, stabilization of a physical parameter), or both. In yet another embodiment, "treating" or "treatment" refers to

preventing or delaying the onset or development or progression of the disease or disorder.

"Prevention" as it relates to indications described herein, including, e.g., LOX-1 associated disorder, means any action that prevents or slows a worsening in e.g., LOX-1 associated disease parameters, as described below, in a patient at risk for said worsening.

The term "vector" is intended to refer to a polynucleotide molecule capable of transporting another polynucleotide to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments may be ligated. Another type of vector is a viral vector, such as an adeno-associated viral vector (AAV, or AAV2), wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (*e.g.*, bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (*e.g.*, non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors" (or simply, "expression vectors"). In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" may be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (*e.g.*, replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figures 1A-1C depicts the inhibition of OxLDL binding to LOX-1 protein by the LOX-1 antibodies of the invention. Figure 1A shows high binding OxLDL, Figure 1B shows malondialdehyde-LDL, and Figure 1C shows hypochlorite modified LDL, all as described herein.

Figure 2 depicts LOX-1 antibodies inhibiting dil-labeled OxLDL binding to human LOX-1 transfected HEK293 cells.

Figure 3 depicts a dose response curve of LOX-1 antibody inhibition of oxLDL induced reactive oxygen species (ROS) production in human LOX-1 transfected HEK293 cells.

Figures 4A-4F demonstrate LOX-1 antibodies (antibodies alone or in the presence of a cross-linking Fab_2) inhibiting oxLDL induced reactive oxygen species (ROS) production in human LOX-1 transfected HEK293 cells. Figure 4A shows antibody FF1, Figure 4B shows antibody FF3, Figure 4C shows antibody FF4, Figure 4D shows antibody FF5, Figure 4E shows antibody FF6, and Figure 4F shows control hIgG1-LALA.

Figure 5 depicts LOX-1 antibodies binding to LOX-1 on the surface of human neutrophils.

Figures 6A-6B depict antibody dissociation constant (K_D) determination by solution equilibrium titration (SET) assays with human or cynomolgus monkey APP-Avi-LOX-1 proteins. Figure 6A depicts data for human LOX-1, and Figure 6B depicts data for cyno LOX-1.

DETAILED DESCRIPTION

The present invention is based, in part, on the discovery of antibody molecules that specifically bind to LOX-1 and inhibit its biological activities. The invention relates to both full IgG format antibodies as well as antigen binding fragments thereof, such as Fab fragments (e.g., antibodies E2E10, FF1, FF3, FF4, FF5, FF6).

Accordingly, the present invention provides antibodies that specifically bind to LOX-1 (*e.g.*, human LOX-1 and cynomolgus monkey LOX-1), pharmaceutical compositions, production methods, and methods of use of such antibodies and compositions.

LOX-1 Proteins

The present invention provides antibodies that specifically bind to LOX-1 and inhibit its biological activities, including its pro-oxidative and pro-inflammatory activities. LOX-1, a receptor for oxidatively modified LDLs (oxLDLs), is expressed on the surface of

vascular cells (endothelial cells and smooth muscle cells), neutrophils, monocytes and macrophages, and platelets. Furthermore, LOX-1 is upregulated in vascular diseases, including in human and animal atherosclerotic lesions (Kataoka H, et al., Circulation 99; 3110-3117). LOX-1 is also upregulated in systemic inflammatory/autoimmune diseases (e.g., rheumatoid arthritis, uveitis, age-related macular degeneration, and pre-eclampsia). OxLDLs are implicated in the pathogenesis of vascular disease. In addition to oxLDLs, LOX-1 binds other ligands including acetylated LDL, advanced glycation end products (AGEs), heat shock protein 70, (HSP70), apoptotic cells, aged red blood cells, leukocytes, activated platelets, bacteria, phosphatidylserine, and C reactive protein (CRP).

LOX-1 is a type-II membrane protein which belongs to the C-type lectin family. LOX-1 also is classified as a class E scavenger receptor. LOX-1 consists of 4 domains: a short N-terminal cytoplasmic domain, a transmembrane region, a connecting neck, and a lectin-like domain at the C-terminus. The C-terminal lectin-like domain (CTLD; also referred to as the oxLDL binding domain) is the ligand binding domain (Sawamura T, et al., Nature 386; 73-77; Shi X, et al., J Cell Sci. 114; 1273-1282). Human LOX-1 has the sequence as set out in Table 1 (SEQ ID NO:1), and has been described in previous reports and literature (Nature, Vol. 386, p. 73-77, 1997; Genomics, Vol. 54, No. 2, p. 191-199, 1998; Biochem. J., Vol. 339, Part 1, P. 177-184, 1999; Genbank Accession No. NP 002534).

The oxLDL / LOX-1 pathway contributes to oxidative stress, vascular inflammation, atherosclerosis, and impaired tissue blood flow and oxygen delivery. Activation of LOX-1 by binding of LOX-1 ligands (e.g., oxLDLs) results in generation of reactive oxygen species due to activation of NADPH oxidase, and subsequent activation of NFkB and MAP kinase pathways resulting in inflammation. The oxLDL/LOX-1 signaling pathway acts as a positive feedback loop, in that LOX-1 induced reactive oxygen species results in formation of additional oxLDL and upregulates LOX-1 expression. Binding of oxLDLs to LOX-1 expressed on the surface of macrophages also results in uptake of oxLDL which contributes to foam cell formation and atherosclerosis. Importantly, vascular inflammation is thought to be critical to the pathobiology of acute thrombotic complications of atherosclerosis including myocardial infarction and ischemic stroke. LOX-1 activation has also been shown to alter vasomotor function by impairing vasodilation by a mechanism involving NADPH oxidase. Impaired vasodilation has been shown to occur in patients with chronic coronary artery disease and angina, and in patients with peripheral artery disease and claudication.

Studies with LOX-1 knockout mice and LOX-1 antagonist antibodies have shown that inhibition of LOX-1 can have beneficial cardiovascular effects. For example, knocking out LOX-1 prevents oxLDL-mediated impairment of vasorelaxation and reduces atherosclerosis (Mehta et al, Circulation Research 2007, 100: 1634). In addition, anti-LOX-1 antibodies have been shown to (i) block oxLDL-induced oxidative stress in human endothelial cells (Ou et al., J Appl Phys 2010, 108: 1745); and (ii) inhibit superoxide production and restore eNOS expression, resulting in improved NO bioavailability and vasodilation (Xu et al., Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2007, 27: 871-877).

We propose that inhibiting LOX-1, for example through administration of the anti-LOX-1 antibodies of the invention, will improve blood flow and oxygen delivery to ischemic tissue, resulting in therapeutic benefit to patients with chronic vascular disease, including angina, claudication, and critical limb ischemia. Inhibiting LOX-1, for example through administration of the anti-LOX-1 antibodies of the invention, may also slow or reverse the progression of atherosclerosis and reduce the incidence of its acute thrombotic complications (e.g., acute coronary syndrome, unstable angina, myocardial infarction, and ischemic stroke).

LOX-1 Antibodies & Antigen Binding Fragments

The present invention provides antibodies that specifically bind to LOX-1. In some embodiments, the present invention provides antibodies that specifically bind to human and cynomolgus monkey LOX-1. Antibodies of the invention include, but are not limited to, the human monoclonal antibodies and Fabs, isolated as described in the Examples.

The present invention provides antibodies that specifically bind a LOX-1 protein (*e.g.*, human and cynomolgus monkey LOX-1), wherein the antibodies comprise a VH domain having an amino acid sequence of SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74, or 94. The present invention also provides antibodies that specifically bind to a LOX-1 protein, wherein the antibodies comprise a VH CDR having an amino acid sequence of any one of the VH CDRs listed in Table 1, *infra*. In particular, the invention provides antibodies that specifically bind to an LOX-1 protein (*e.g.*, human and cynomolgus monkey LOX-1), wherein the antibodies comprise (or alternatively, consist of) one, two, three, or more VH CDRs having an amino acid sequence of any of the VH CDRs listed in Table 1, *infra*.

The present invention provides antibodies that specifically bind to a LOX-1 protein, said antibodies comprising a VL domain having an amino acid sequence of SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, or 104. The present invention also provides antibodies that specifically bind to an LOX-1 protein (*e.g.*, human and cynomolgus monkey LOX-1), said antibodies comprising a VL CDR having an amino acid sequence of any one of the VL CDRs listed in Table 2, *infra*. In particular, the invention provides antibodies that specifically bind to an LOX-1 protein (*e.g.*, human and cynomolgus monkey LOX-1), said antibodies comprising (or alternatively, consisting of) one, two, three or more VL CDRs having an amino acid sequence of any of the VL CDRs listed in Table 1, *infra*.

Other antibodies of the invention include amino acids that have been mutated, yet have at least 60, 70, 80, 85, 90 or 95 percent identity in the CDR regions with the CDR regions depicted in the sequences described in Table 2. In some embodiments, it includes mutant amino acid sequences wherein no more than 1, 2, 3, 4 or 5 amino acids have been mutated in the CDR regions when compared with the CDR regions depicted in the sequence described in Table 1.

The present invention also provides nucleic acid sequences that encode VH, VL, the full length heavy chain, and the full length light chain of the antibodies that specifically bind to a LOX-1 protein (*e.g.*, human and cynomolgus monkey LOX-1). Such nucleic acid sequences can be optimized for expression in mammalian cells (for example, Table 1 shows the optimized nucleic acid sequences for the heavy chain and light chain of antibodies of the invention).

Table 1. Examples of LOX-1 Antibodies, Fabs and LOX-1 Proteins

Sequence Description	Sequence Identifier (SEQ ID NO:)	Amino acid or polynucleotide sequence
Human LOX-1 full-length protein sequence (NCBI Reference Sequence: NM_002543.3)	1	MTFDDLKIQTVKDQPDEKSNGKKAKGLQFLYSPWWCLAAATLGVLCLGLVVTIM VLGMQLSQVSDLLTQEQANLTHQKKKLEGQISARQQAEEASQESENELKEMIET LARKLNEKSKEQMELHHQNLNLQETLKRVANCSAPCPQDWIWHGENCYLFSSGS FNWEKSQEKCLSLDAKLLKINSTADLDFIQQAISYSSFPFWMGLSRRNPSYPWL WEDGSPLMPHLFRVRGAVSQTYPSGTCAYIQRGAVYAENCILAAFSICQKKANL RAQ
Human LOX-1 full-length nucleotide sequence (NCBI Reference Sequence: NM_002543.3)	2	ATGACTTTTGATGACCTAAAGATCCAGACTGTGAAGGACCAGCCTGATGAGAAG TCAAATGGAAAAAAAGCTAAAGGTCTTCAGTTTCTTTACTCTCCATGGTGGTGC CTGGCTGCTGCGACTCTAGGGGTCCTTTGCCTGGGATTAGTAGTGACCATTATG GTGCTGGGCATGCAATTATCCCAGGTGTCTGACCTCCTAACACAAGAGCAAGCA AACCTAACTCACCAGAAAAAGAAACTGGAGGGACAGATCTCAGCCCGGCAACAA GCAGAAGAAGCTTCACAGGAGTCAGAAAACGAACTCAAGGAAATGATAGAAACC CTTGCTCGGAAGCTGAATGAGAAATCCAAAGAGCAAATGGAACTTCACCACCAG AATCTGAATCTCCAAGAAACACTGAAGAGAGTAGCAAATTGTTCAGCTCCTTGT CCGCAAGACTGGATCTGGCATGGAGAAAACTGTTACCTATTTTCCTCGGGCTCA TTTAACTGGGAAAAGAGCCAAGAGAAGTGCTTGTCTTTGGATGCCAAGTTGCTG

		AAAATTAATAGCACAGCTGATCTGGACTTCATCCAGCAAGCAATTTCCTATTCC AGTTTTCCATTCTGGATGGGGCTGTCTCGGAGGAACCCCAGCTACCCATGGCTC TGGGAGGACGGTTCTCCTTTGATGCCCCACTTATTTAGAGTCCGAGGCGCTGTC TCCCAGACATACCCTTCAGGTACCTGTGCATATATACAACGAGGAGCTGTTTAT GCGGAAAACTGCATTTTAGCTGCCTTCAGTATATGTCAGAAGAAGGCAAACCTA AGAGCACAG
Amino Acid Sequence of mature APP-Avi-soluble human LOX-1(61-273) (APP and Avi tags underlined)	6	EFRHGLNDIFEAQKIEWHESQVSDLLTQEQANLTHQKKKLEGQISARQQ AEEASQESENELKEMIETLARKLNEKSKEQMELHHQNLNLQETLKRVAN CSAPCPQDWIWHGENCYLFSSGSFNWEKSQEKCLSLDAKLLKINSTADL DFIQQAISYSSFPFWMGLSRRNPSYPWLWEDGSPLMPHLFRVRGAVSQT YPSGTCAYIQRGAVYAENCILAAFSICQKKANLRAQ
Nucleotide sequence of APP-Avi-soluble human LOX-1(61-273) (Plasnova# NPL014428)	7	ATGCCCCTGCTGCTGCTCCTCCCCCTGCTGTGGGCTGGCGCCCTGGCCGAGTTC CGGCACGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGAAAATCGAGTGGCACGAGAGC CAGGTGTCCGATCTGCTGACCCAGGAACAGGCCAACCTGACCCACCAGAAGAAG AAGCTGGAAGGCCAGATCAGCGCCAGACAGCAGGCCGAGGAAGCCAGCCAGGAA AGCGAGAACGAGCTGAAAGAGATGATCGAGACACTGGCCCGGAAGCTGAACGAG AAGTCCAAAGAACAGATGGAACTGCACCACCAGAACCTGAATCTGCAGGAAACC CTGAAGCGGGTCGCCAACTGCAGCGCCCCCTGCCCCCAGGACTGGATCTGGCAC GGCGAGAACTGCTACCTGTTCAGCAGCGGCAGCTTCAACTGGGAGAAGTCCCAG GAAAAGTGCCTGAGCCTGGACGCCAAGCTGCTGAAGATCAACAGCACCGCCGAC CTGGACTTCATCCAGCAGGCCATCAGCTACAGCAGCTTCCCTTTCTGGATGGGC CTGAGCCGGCGGAACCCCAGCTACCCTTGGCTCTGGGAGGACGGCAGCCCCCTG ATGCCCCACCTGTTCAGAGTGCGGGGAGCTGTGAGCCAGACCTACCCCAGCGGC ACCTGTGCCTACATCCAGCGCGGAGCCGTGTACGCCGAGAACTGCATCCTGGCC GCCTTCAGCATCTGCCAGAAGAAGGCCAATCTGCGGGCCCAGTAATAA
FF1		
HCDR1 (Kabat)	8	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	9	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	10	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	11	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	12	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	13	WLPMDY
VH	14	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQAPGQGLEWMGAIHPG SGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQG TLVTVSS
DNA encoding VH	15	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtg aaggtgtcctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgg gtgcgacaggctccaggccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggc tctggcggcgctgcttacgtgcagaaattccagggcagagtgaccatgacccgg gacacctctacctccaccgcctacatggaactgtcctccctgcggagcgacgac accgccgtgtactactgtgcccggtggctgcccatggactattggggccagggc accctcgtgaccgtgtcctct
Heavy Chain	16	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQAPGQGLEWMGAIHPG SGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

		VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
DNA Encoding Heavy Chain	17	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtg aaggtgtcctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgg gtgcgacaggctccaggccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggc tctggcggcgctgcttacgtgcagaaattccagggcagagtgaccatgacccgg gacacctctacctccaccgcctacatggaactgtcctccctgcggagcgacgac accgccgtgtactactgtgcccggtggctgcccatggactattggggccagggc accctcgtgaccgtgtcctctgcttctaccaagggcccttccgtgttcccctctg gcccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtg aaggactacttccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacc agcggagtgcacaccttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctg tcctccgtggtgacagtgccttcctccagcctgggcacacagacctacatctgc aacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaagcgggtggagcctaag tcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagccgctggc ggcccttctgtgtttctgttcccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcc cggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaa gtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaag cctcgggaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtg ctgcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtgcaaggtgtccaacaag gccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagcctagg gaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgaccaagaaccag gtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccttccgatatcgccgtggag tgggagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctg gactccgacggctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccgg tggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaac cactacacccagaagtccctgtccctgtctcccggcaag
LCDR1 (Kabat)	18	RASQGINNWLV
LCDR2 (Kabat)	19	AASSLQS
LCDR3 (Kabat)	20	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	21	SQGINNW
LCDR2 (Chothia)	22	AAS
LCDR3 (Chothia)	23	YLITPY
VL	24	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFATYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
DNA Encoding VL	25	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacaga gtgaccatcacctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtat cagcagaagcccggcaaggcccccaagctgctgatctacgctgcctccagtctg cagtccggcgtgccctctagattctccggctctggctctggcgccgactatacc

		ctgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcgccacctactactgccagcag tacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaatcaag
Light Chain	26	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFATYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
DNA Light Chain	27	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacaga gtgaccatcacctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtat cagcagaagcccggcaaggccccaagctgctgatctacgctgcctccagtctg cagtccggcgtgccctctagattctccggctctggctctggcgccgactatacc ctgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcgccacctactactgccagcag tacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaatcaagcgt acggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcagctgaag agcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggcc aaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagc gtcaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgacc ctgagcaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccac cagggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacaggggcgagtgc
FF3		
HCDR1 (Kabat)	28	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	29	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	30	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	31	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	32	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	33	WLPMDY
VH	34	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQAPGQGLEWMGAIHPG SGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQG TLVTVSS
DNA VH	35	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtg aaggtgtcctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgg gtgcgacaggctccaggccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggc tctggcggcgctgcttacgtgcagaaattccagggcagagtgaccatgacccgg gacacctccatctccaccgcctacatggaactgtcccggctgagatccgacgac accgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactggggccagggc acactcgtgaccgtgtcctct
Heavy Chain	36	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQAPGQGLEWMGAIHPG SGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

		VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
DNA Heavy Chain	37	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtg aaggtgtcctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgg gtgcgacaggctccaggccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggc tctggcggcgctgcttacgtgcagaaattccagggcagagtgaccatgacccgg gacacctccatctccaccgcctacatggaactgtcccggctgagatccgacgac accgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactggggccagggc acactcgtgaccgtgtcctctgcttccaccaagggcccttccgtgttccctctg gcccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtg aaggactacttccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacc agcggagtgcacaccttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctg tcctccgtggtgacagtgccttcctccagcctgggcacacagacctacatctgc aacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaagcgggtggagcctaag tcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagccgctggc ggcccttctgtgtttctgttcccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcc cggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaa gtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaag cctcgggaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtg ctgcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtgcaaggtgtccaacaag gccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagcctagg gaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgaccaagaaccag gtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccttccgatatcgccgtggag tgggagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctg gactccgacggctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccgg tggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaac cactacacccagaagtccctgtccctgtctcccggcaag
LCDR1 (Kabat)	38	RASQGINNWLV
LCDR2 (Kabat)	39	AASSLQS
LCDR3 (Kabat)	40	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	41	SQGINNW
LCDR2 (Chothia)	42	AAS
LCDR3 (Chothia)	43	YLITPY
VL	44	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFATYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
DNA VL	45	gacatccagatgacccagtcccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacaga gtgaccatcacctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtat cagcagaagcccggcaaggcccccaagctgctgatctacgctgcctccagtctg cagtccggcgtgccctctagattctccggctctggctctggcgccgactatacc

		ctgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcgccacctactactgccagcag tacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaatcaag
Light Chain	46	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGADYTLTISSLQPEDFATYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
DNA Light Chain	47	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacaga gtgaccatcacctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtat cagcagaagcccggcaaggccccaagctgctgatctacgctgcctccagtctg cagtccggcgtgccctctagattctccggctctggctctggcgccgactatacc ctgaccatctccagcctgcagcccgaggacttcgccacctactactgccagcag tacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaatcaagcgt acggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcagctgaag agcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggcc aaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagc gtcaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgacc ctgagcaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccac cagggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacaggggcgagtgc
FF4		
HCDR1 (Kabat)	48	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	49	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	50	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	51	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	52	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	53	WLPMDY
VH	54	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQAPGQGLEWMGAIHPG SGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQG TLVTVSS
DNA VH	55	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtg aaggtgtcctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgg gtgcgacaggctccaggccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggc tctggcggcgctgcttacgtgcagaaattccagggcagagtgaccatgacccgg gacacctccatctccaccgcctacatggaactgtcccggctgagatccgacgac accgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactggggccagggc acactcgtgaccgtgtcctct
Heavy Chain	56	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQAPGQGLEWMGAIHPG SGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

		VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
DNA Heavy Chain	57	Caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtg aaggtgtcctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgg gtgcgacaggctccaggccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggc tctggcggcgctgcttacgtgcagaaattccagggcagagtgaccatgacccgg gacacctccatctccaccgcctacatggaactgtcccggctgagatccgacgac accgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactggggccagggc acactcgtgaccgtgtcctctgcttccaccaagggcccttccgtgttcccctg gcccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtg aaggactacttccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacc agcggagtgcacaccttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctg tcctccgtggtgacagtgccttcctccagcctgggcacacagacctacatctgc aacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaagcgggtggagcctaag tcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagccgctggc ggcccttctgtgtttctgttcccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcc cggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaa gtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaag cctcgggaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtg ctgcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtgcaaggtgtccaacaag gccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagcctagg gaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgaccaagaaccag gtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccttccgatatcgccgtggag tgggagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctg gactccgacggctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccgg tggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaac cactacacccagaagtccctgtccctgtctcccggcaag
LCDR1 (Kabat)	58	RASQGITNWLA
LCDR2 (Kabat)	59	AASILES
LCDR3 (Kabat)	60	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	61	SQGITNW
LCDR2 (Chothia)	62	AAS
LCDR3 (Chothia)	63	YLITPY
VL	64	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGITNWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASIL ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
DNA VL	65	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacaga gtgaccatcacctgtagagcctcccagggcatcaccaactggctggcctggtat cagcagaagcccggcaaggcccccaagctgctgatctacgccgcctccatcctg gaatccggcgtgccctctagattctccggctctggctctggcaccgactatacc

		ctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccacctactactgccagcag tacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaatcaag
Light Chain	66	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGITNWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASIL ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
DNA Light Chain	67	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacaga gtgaccatcacctgtagagcctcccagggcatcaccaactggctggcctggtat cagcagaagcccggcaaggccccaagctgctgatctacgccgcctccatcctg gaatccggcgtgccctctagattctccggctctggctctggcaccgactatacc ctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccacctactactgccagcag tacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaatcaagcgt acggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcagctgaag agcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggcc aaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagc gtcaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgacc ctgagcaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccac cagggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacaggggcgagtgc
FF5		
HCDR1 (Kabat)	68	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	69	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	70	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	71	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	72	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	73	WLPMDY
VH	74	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQAPGQGLEWMGAIHPG SGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQG TLVTVSS
DNA VH	75	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtg aaggtgtcctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgg gtgcgacaggctccaggccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggc tctggcggcgctgcttacgtgcagaaattccagggcagagtgaccatgacccgg gacacctccatctccaccgcctacatggaactgtcccggctgagatccgacgac accgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactggggccagggc acactcgtgaccgtgtcctct
Heavy Chain	76	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQAPGQGLEWMGAIHPG SGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWLPMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

		VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
DNA Heavy Chain	77	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtg aaggtgtcctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgg gtgcgacaggctccaggccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggc tctggcggcgctgcttacgtgcagaaattccagggcagagtgaccatgacccgg gacacctccatctccaccgcctacatggaactgtcccggctgagatccgacgac accgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatggactactggggccagggc acactcgtgaccgtgtcctctgcttccaccaagggcccttccgtgttcccctctg gcccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtg aaggactacttccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacc agcggagtgcacaccttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctg tcctccgtggtgacagtgccttcctccagcctgggcacacagacctacatctgc aacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaagcgggtggagcctaag tcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagccgctggc ggcccttctgtgtttctgttcccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcc cggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaa gtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaag cctcgggaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtg ctgcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtgcaaggtgtccaacaag gccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagcctagg gaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgaccaagaaccag gtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctaccctccgatatcgccgtggag tgggagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctg gactccgacggctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccgg tggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaac cactacacccagaagtccctgtccctgtctcccggcaag
LCDR1 (Kabat)	78	RASQGINNWLV
LCDR2 (Kabat)	79	AASRLES
LCDR3 (Kabat)	80	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	81	SQGINNW
LCDR2 (Chothia)	82	AAS
LCDR3 (Chothia)	83	YLITPY
VL	84	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPGKAPKLLLYAASRL ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
DNA VL	85	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacaga gtgaccatcacctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtat cagcagaagcccggcaaggcccccaaactgctgctgtacgccgcctccagactg gaatctggcgtgccctccagattctccggctctggctctggcaccgactatacc

		ctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccacctactactgccagcag tacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaatcaag
Light Chain	86	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPGKAPKLLLYAASRL ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
DNA Light Chain	87	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacaga gtgaccatcacctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtat cagcagaagcccggcaaggccccaaactgctgctgtacgccgcctccagactg gaatctggcgtgccctccagattctccggctctggctctggcaccgactatacc ctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccacctactactgccagcag tacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaatcaagcgt acggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcagctgaag agcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggcc aaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagc gtcaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgacc ctgagcaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccac cagggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacaggggcgagtgc
FF6		
HCDR1 (Kabat)	88	DYEVH
HCDR2 (Kabat)	89	AIHPGSGGAAYVQKFQG
HCDR3 (Kabat)	90	WLPIDY
HCDR1 (Chothia)	91	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	92	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	93	WLPIDY
VH	94	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQAPGQGLEWMGAIHPG SGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWLPIDYWGQG TLVTVSS
DNA VH	95	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtg aaggtgtcctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgg gtgcgacaggctccaggccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggc tctggcggcgctgcttacgtgcagaaattccagggcagagtgaccatgacccgg gacacctccatctccaccgcctacatggaactgtcccggctgagatccgacgac accgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatcgactactggggccagggc acactcgtgaccgtgtcctct
Heavy Chain	96	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEVHWVRQAPGQGLEWMGAIHPG SGGAAYVQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWLPIDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

		VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
DNA Heavy Chain	97	caggtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaaacctggcgcctccgtg aaggtgtcctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacgaggtgcactgg gtgcgacaggctccaggccagggactggaatggatgggcgctatccatcctggc tctggcggcgctgcttacgtgcagaaattccagggcagagtgaccatgacccgg gacacctccatctccaccgcctacatggaactgtcccggctgagatccgacgac accgccgtgtactactgcgccagatggctgcccatcgactactggggccagggc acactcgtgaccgtgtcctctgcttccaccaagggcccttccgtgttcccctg gcccccttccagcaagtctacctctggcggcaccgcagctctgggctgcctggtg aaggactacttccctgagcctgtgacagtgtcctggaactctggcgccctgacc agcggagtgcacaccttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctg tcctccgtggtgacagtgccttcctccagcctgggcacacagacctacatctgc aacgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaagcgggtggagcctaag tcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgcccctgaagccgctggc ggcccttctgtgtttctgttcccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcc cggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcccacgaggatcctgaa gtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaag cctcgggaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtg ctgcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtgcaaggtgtccaacaag gccctgcctgcccctatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagcctagg gaaccccaggtgtacaccctgccacccagccgggaagaaatgaccaagaaccag gtgtccctgacctgtctggtgaagggcttctacccttccgatatcgccgtggag tgggagtctaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctg gactccgacggctccttcttcctgtactccaaactgaccgtggacaagtcccgg tggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaac cactacacccagaagtccctgtccctgtctcccggcaag
LCDR1 (Kabat)	98	RASQGINNWLV
LCDR2 (Kabat)	99	AASRLES
LCDR3 (Kabat)	100	QQYLITPYT
LCDR1 (Chothia)	101	SQGINNW
LCDR2 (Chothia)	102	AAS
LCDR3 (Chothia)	103	YLITPY
VL	104	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPGKAPKLLLYAASRL ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIK
DNA VL	105	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacaga gtgaccatcacctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtat cagcagaagcccggcaaggcccccaaactgctgctgtacgccgcctccagactg gaatctggcgtgccctccagattctccggctctggctctggcaccgactatacc

		ctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccacctactactgccagcag tacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaatcaag
Light Chain	106	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINNWLVWYQQKPGKAPKLLLYAASRL ESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQYLITPYTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
DNA Light Chain	107	gacatccagatgacccagtccccctcctccgtgtctgcttccgtgggcgacaga gtgaccatcacctgtagagcctcccagggcatcaacaactggctcgtgtggtat cagcagaagcccggcaaggcccccaaactgctgctgtacgccgcctccagactg gaatctggcgtgccctccagattctccggctctggctctggcaccgactatacc ctgaccatctccagcctgcagcccgaggatatcgccacctactactgccagcag tacctgatcacccctacaccttcggccagggcaccaagctggaaatcaagcgt acggtggccgctcccagcgtgttcatcttcccccaagcgacgagcagctgaag agcggcaccgccagcgtggtgtgtctgctgaacaacttctaccccagggaggcc aaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagagcggcaacagccaggagagc gtcaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagcagcaccctgacc ctgagcaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgtgaggtgacccac cagggcctgtccagccccgtgaccaagagcttcaacaggggcgagtgc
E2E10 (murine parental)		
HCDR1 (Kabat)	108	DYEMH
HCDR2 (Kabat)	109	AIHPGSGGAAYIQKFKG
HCDR3 (Kabat)	110	WLPMDY
HCDR1 (Chothia)	111	GYTFTDY
HCDR2 (Chothia)	112	HPGSGG
HCDR3 (Chothia)	113	WLPMDY
VH	114	QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAIHPG SGGAAYIQKFKGKATLTADKSSSTAHMELSSLTSEDSAVYYCTRWLPMDYWGQG TSVTVSS
DNA VH	115	caggtccagctgcagcagtcaggagccgaactggtgcggcccggagcttctgtc aaactgagctgcaaggcactgggctacaccttcacagactatgagatgcactgg gtgaaacagaccccgtccatggactggaatggatcggagcaattcaccctgga agcggaggagcagcttacatccagaagtttaaagggaaggcaactctgaccgcc gacaagagctcctctacagcccatatggagctgagttcactgactagcgaagat agcgccgtgtactattgtacccgctggctgcctatggactattggggacagggg acttcagtgacagtgagttca
LCDR1 (Kabat)	116	KASDHINNWLA
LCDR2 (Kabat)	117	GATSLET
LCDR3 (Kabat)	118	QQYLITPYT

LCDR1 (Chothia)	119	SDHINNW
LCDR2 (Chothia)	120	GAT
LCDR3 (Chothia)	121	YLITPY
VL	122	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSL ETGVPSRFSGSGSGKDYTLSITGLQTEDVATYYCQQYLITPYTFGGGTKLEIK
DNA VL	123	gatattcagatgacccagagtagttcttacctgagcgtgtccctgggaggaagg gtcaccatcacatgcaaggcaagcgaccacattaacaattggctggcctggtac cagcagaaaccaggaaacgcacctcgactgctgatcagcggagctacttccctg gagaccggcgtgccctctagattctctggaagtggctcagggaaggactataca ctgagcattactggcctgcagaccgaagatgtcgctacatactattgtcagcag tacctgattacaccctacactttcggcggcggaactaaactggagattaag

Other antibodies of the invention include those where the amino acids or nucleic acids encoding the amino acids have been mutated, yet have at least 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, or 95 percent identity to the sequences described in Table 1. Some embodiments include mutant amino acid sequences wherein no more than 1, 2, 3, 4 or 5 amino acids have been mutated in the variable regions when compared with the variable regions depicted in the sequence described in Table 1, while retaining substantially the same antigen binding activity.

Since each of these antibodies can bind to LOX-1, the VH, VL, full length light chain, and full length heavy chain sequences (amino acid sequences and the nucleotide sequences encoding the amino acid sequences) can be "mixed and matched" to create other LOX-1-binding antibodies of the invention. Such "mixed and matched" LOX-1-binding antibodies can be tested using the binding assays known in the art (*e.g.*, ELISAs, and other assays described in the Example section). When these chains are mixed and matched, a VH sequence from a particular VH/VL pairing should be replaced with a structurally similar VH sequence. Likewise a full length heavy chain sequence from a particular full length heavy chain / full length light chain pairing should be replaced with a structurally similar full length heavy chain sequence. Likewise, a VL sequence from a particular VH/VL pairing should be replaced with a structurally similar VL sequence. Likewise a full length light chain 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.

Accordingly, in one aspect, the invention provides an isolated antibody or antigen binding region thereof having: a heavy chain variable domain comprising an amino acid

sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74, and 94, and a light chain variable domain comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, and 104, wherein the antibody specifically binds to LOX-1 (*e.g.*, human and cynomolgus monkey LOX-1).

More specifically, in certain aspects, the invention provides an isolated antibody or antigen binding region thereof having a heavy chain variable domain and a light chain variable domain comprising amino acid sequences selected from SEQ ID NOs: 14 and 24; 34 and 44; 54 and 64; 74 and 84; or 94 and 104, respectively.

In another aspect, the invention provides (i) an isolated antibody having: a full length heavy chain comprising an amino acid sequence that has been optimized for expression in a mammalian cell selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 16, 36, 56, 76, or 96, and a full length light chain comprising an amino acid sequence that has been optimized for expression in a mammalian cell selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 26, 46, 66, 86, or 106; or (ii) a functional protein comprising an antigen binding portion thereof. More specifically, in certain aspects, the invention provides an isolated antibody or antigen binding region thereof having a heavy chain and a light chain comprising amino acid sequences selected from SEQ ID NOs: 14 and 24; 34 and 44; 54 and 64; 74 and 84; or 94 and 104, respectively.

The terms "complementarity determining region," and "CDR," as used herein refer to the sequences of amino acids within antibody variable regions which confer antigen specificity and binding affinity. In general, there are three CDRs in each heavy chain variable region (HCDR1, HCDR2, HCDR3) and three CDRs in each light chain variable region (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

The precise amino acid sequence boundaries of a given CDR can be readily determined using any of a number of well-known schemes, including those described by Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD ("Kabat" numbering scheme), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 ("Chothia" numbering scheme).

For example, under Kabat, the CDR amino acid residues of antibody FF1 in the heavy chain variable domain (VH) are numbered 31-35 (HCDR1), 50-66 (HCDR2), and 99-104 (HCDR3); and the CDR amino acid residues in the light chain variable domain (VL) are numbered 24-34 (LCDR1), 50-55 (LCDR2), and 89-97 (LCDR3). Under Chothia the CDR amino acids in the VH are numbered 26-32 (HCDR1), 52-57 (HCDR2), and 99-104 (HCDR3); and the amino acid residues in VL are numbered 26-32 (LCDR1), 50-52

(LCDR2), and 91-96 (LCDR3). By combining the CDR definitions of both Kabat and Chothia, the CDRs consist of amino acid residues 26-35 (HCDR1), 50-66 (HCDR2), and 90-104 (HCDR3) in human VH and amino acid residues 24-34 (LCDR1), 50-55 (LCDR2), and 89-97 (LCDR3) in human VL.

In another aspect, the present invention provides LOX-1 binding antibodies that comprise the heavy chain and light chain CDR1s, CDR2s, and CDR3s as described in Table 1, or combinations thereof. The amino acid sequences of the VH CDR1s of the antibodies are shown in SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, and 88. The amino acid sequences of the VH CDR2s of the antibodies and are shown in SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, and 89. The amino acid sequences of the VH CDR3s of the antibodies are shown in SEQ ID NOs: 10, 30, 50, 70, and 90. The amino acid sequences of the VL CDR1s of the antibodies are shown in SEQ ID NOs: 18, 38, 58, 78, and 98. The amino acid sequences of the VL CDR2s of the antibodies are shown in SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, and 99. The amino acid sequences of the VL CDR3s of the antibodies are shown in SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, and 100. These CDR regions are delineated using the Kabat system.

Alternatively, as defined using the Chothia system (Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948), the amino acid sequences of the VH CDR1s of the antibodies are shown in SEQ ID NOs: 11, 31, 51, 71, and 91. The amino acid sequences of the VH CDR2s of the antibodies and are shown in SEQ ID NOs: 12, 32, 52, 72, and 92. The amino acid sequences of the VH CDR3s of the antibodies are shown in SEQ ID NOs: 13, 33, 53, 73, and 93. The amino acid sequences of the VL CDR1s of the antibodies are shown in SEQ ID NOs: 21, 41, 61, 81, and 101. The amino acid sequences of the VL CDR2s of the antibodies are shown in SEQ ID NOs: 22, 42, 62, 82, and 102. The amino acid sequences of the VL CDR3s of the antibodies are shown in SEQ ID NOs: 23, 43, 63, 83, and 103.

Given that each of these antibodies can bind to LOX-1 and that antigen-binding specificity is provided primarily by the CDR1, 2 and 3 regions, the VH CDR1, 2 and 3 sequences and VL CDR1, 2 and 3 sequences can be "mixed and matched" (*i.e.*, CDRs from different antibodies can be mixed and matched, although each antibody preferably contains a VH CDR1, 2 and 3 and a VL CDR1, 2 and 3 to create other LOX-1binding molecules of the invention. Such "mixed and matched" LOX-1binding antibodies can be tested using the binding assays known in the art and those described in the Examples (*e.g.*, ELISAs, SET, Biacore). When VH CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence from a particular VH sequence should be replaced

with a structurally similar CDR sequence(s). Likewise, when VL CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence from a particular VL sequence should be replaced with a structurally similar CDR sequence(s). It will be readily apparent to the ordinarily skilled artisan that novel VH and VL sequences can be created by substituting one or more VH and/or VL CDR region sequences with structurally similar sequences from the CDR sequences shown herein for monoclonal antibodies of the present invention. In addition to the foregoing, in one embodiment, the antigen binding fragments of the antibodies described herein can comprise a VH CDR1, 2, and 3, or a VL CDR 1, 2, and 3, wherein the fragment binds to LOX-1 as a single variable domain.

In certain embodiments of the invention, the antibodies or antigen binding fragments thereof may have the heavy and light chain sequences of the Fabs described in Table 1. More specifically, the antibody or antigen binding fragments thereof may have the heavy and light sequence of Fab FF1, FF3, FF4, FF5, and FF6.

In other embodiments of the invention the antibody or antigen binding fragment in that specifically binds LOX-1comprises a heavy chain variable region CDR1, a heavy chain variable region CDR2, a heavy chain variable region CDR3, a light chain variable region CDR1, a light chain variable region CDR2, and a light chain variable region CDR3 as defined by Kabat and described in Table 1. In still other embodiments of the invention the antibody or antigen binding fragment in that specifically binds LOX-1comprises a heavy chain variable region CDR1, a heavy chain variable region CDR2, a heavy chain variable region CDR3, a light chain variable region CDR1, a light chain variable region CDR2, and a light chain variable region CDR3 as defined by Chothia and described in Table 1.

In a specific embodiment, the invention includes an antibody that specifically binds to LOX-1 comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 8; a heavy chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 9; a heavy chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 10; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 18; a light chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 19; and a light chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 20.

In another specific embodiment, the invention includes an antibody that specifically binds to LOX-1 comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 28; a heavy chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 29; a heavy chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 30; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 38; a

light chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 39; and a light chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 40.

In another specific embodiment, the invention includes an antibody that specifically binds to LOX-1 comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 48; a heavy chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 49; a heavy chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 50; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 58; a light chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 59; and a light chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 60.

In another specific embodiment, the invention includes an antibody that specifically binds to LOX-1 comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 68; a heavy chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 69; a heavy chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 70; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 78; a light chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 79; and a light chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 80.

In another specific embodiment, the invention includes an antibody that specifically binds to LOX-1 comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 88; a heavy chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 89; a heavy chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 90; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 98; a light chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 99; and a light chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 100.

In another specific embodiment, the invention includes an antibody that specifically binds to LOX-1 comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 11; a heavy chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 12; a heavy chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 13; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 21; a light chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 22; and a light chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 23.

In another specific embodiment, the invention includes an antibody that specifically binds to LOX-1 comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 31; a heavy chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 32; a heavy chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 33; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 41; a light chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 42; and a light chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 43.

In another specific embodiment, the invention includes an antibody that specifically binds to LOX-1 comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 51; a heavy chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 52; a heavy chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 53; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 61; a light chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 62; and a light chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 63.

In another specific embodiment, the invention includes an antibody that specifically binds to LOX-1 comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 71; a heavy chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 72; a heavy chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 73; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 81; a light chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 82; and a light chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 83.

In another specific embodiment, the invention includes an antibody that specifically binds to LOX-1 comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 91; a heavy chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 92; a heavy chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 93; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 101; a light chain variable region CDR2 of SEQ ID NO: 102; and a light chain variable region CDR3 of SEQ ID NO: 103.

In certain embodiments, the invention includes antibodies or antigen binding fragments that specifically bind to LOX-1 as described in Table 1. In a preferred embodiment, the antibody, or antigen binding fragment, that binds LOX-1 is Fab FF1, FF3, FF4, FF5, and FF6.

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" 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. Such systems include immunizing a transgenic mouse carrying human immunoglobulin genes with the antigen of interest or screening a human immunoglobulin gene library displayed on phage with the antigen of interest. 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 sequence, due to, for example, naturally occurring somatic mutations or intentional introduction of site-directed mutations. However, in the VH or VL framework regions, a selected human antibody typically is at least 90% identical in amino acids sequence 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.

Typically, a recombinant human antibody will display no more than 10 amino acid differences from the amino acid sequence encoded by the human germline immunoglobulin gene in the VH or VL framework regions. In certain cases, the human antibody may display no more than 5, or even no more than 4, 3, 2, or 1 amino acid difference from the amino acid sequence encoded by the germline immunoglobulin gene. Examples of human germline immunoglobulin genes include, but are not limited to the variable domain germline fragments described below, as well as DP47 and DPK9.

Homologous antibodies

In yet another embodiment, the present invention provides an antibody, or an antigen binding fragment thereof, comprising amino acid sequences that are homologous to the sequences described in Table 1, and the antibody binds to a LOX-1 protein (*e.g.*, human and cynomolgus monkey LOX-1), and retains the desired functional properties of those antibodies described in Table 1.

For example, the invention provides an isolated antibody, or a functional antigen binding fragment thereof, comprising a heavy chain variable domain and a light chain variable domain, wherein the heavy chain variable domain comprises an amino acid sequence that is at least 80%, at least 90%, or at least 95% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74, or 94; the light chain variable domain comprises an amino acid sequence that is at least 80%, at least 90%, or at least 95% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, or 104; and the antibody specifically binds to

LOX-1 (*e.g.*, human and cynomolgus monkey LOX-1). In certain aspects of the invention the heavy and light chain sequences further comprise HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, and LCDR3 sequences as defined by Kabat, for example SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 18, 19, and 20, respectively. In certain other aspects of the invention the heavy and light chain sequences further comprise HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, and LCDR3 sequences as defined by Chothia, for example SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 21, 22, and 23, respectively.

In other embodiments, the VH and/or VL amino acid sequences may be 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the sequences set forth in Table 1. In other embodiments, the VH and/or VL amino acid sequences may be identical except for an amino acid substitution in no more than 1,2,3,4 or 5 amino acid positions. An antibody having VH and VL regions having high (*i. e.*, 80% or greater) identity to the VH and VL regions of those described in Table 1 can be obtained by mutagenesis (*e.g.*, site-directed or PCR-mediated mutagenesis) of nucleic acid molecules encoding SEQ ID NOs: 15, 35, 55, 75, or 95 and SEQ ID NOs: 25, 45, 65, 85, or 105, respectively, followed by testing of the encoded altered antibody for retained function using the functional assays described herein.

In other embodiments, the full length heavy chain and/or full length light chain amino acid sequences may be 50% 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the sequences set forth in Table 1. An antibody having a full length heavy chain and full length light chain having high (*i.e.*, 80% or greater) identity to the full length heavy chains of any of SEQ ID NOs : 16, 36, 56, 76, or 96, and full length light chains of any of SEQ ID NOs: 26, 46, 66, 86, or 106, can be obtained by mutagenesis (*e.g.*, site-directed or PCR-mediated mutagenesis) of nucleic acid molecules encoding such polypeptides, followed by testing of the encoded altered antibody for retained function using the functional assays described herein.

In other embodiments, the full length heavy chain and/or full length light chain nucleotide sequences may be 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the sequences set forth in Table 1.

In other embodiments, the variable regions of heavy chain and/or the variable regions of light chain nucleotide sequences may be 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the sequences set forth in Table 1.

As used herein, the percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences (*i.e.*, % identity equals

number of identical positions/total number of positions x 100), taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences. The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm, as described in the non-limiting examples below.

Additionally or alternatively, the protein sequences of the present invention can further be used as a "query sequence" to perform a search against public databases to, for example, identify related sequences. For example, such searches can be performed using the BLAST program (version 2.0) of Altschul, *et al.*, 1990 J.Mol. Biol. 215:403-10.

Antibodies with Conservative Modifications

In certain embodiments, an antibody of the invention has a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences and a light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, wherein one or more of these CDR sequences have specified amino acid sequences based on the antibodies described herein or conservative modifications thereof, and wherein the antibodies retain the desired functional properties of the LOX-1-binding antibodies of the invention.

Accordingly, the invention provides an isolated antibody, or a antigen binding fragment thereof, consisting of a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences and a light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, wherein: the heavy chain variable region CDR1 amino acid sequences are selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, and 88, and conservative modifications thereof; the heavy chain variable region CDR2 amino acid sequences are selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, and 89, and conservative modifications thereof; the heavy chain variable region CDR3 amino acid sequences are selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10, 30, 50, 70, and 90, and conservative modifications thereof; the light chain variable regions CDR1 amino acid sequences are selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 18, 38, 58, 78, and 98, and conservative modifications thereof; the light chain variable regions CDR2 amino acid sequences are selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, and 99, and conservative modifications thereof; the light chain variable regions of CDR3 amino acid sequences are selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, and 100, and conservative modifications thereof; and the antibody or antigen binding fragments thereof specifically binds to LOX-1.

In other embodiments, the antibody of the invention is optimized for expression in a mammalian cell has a full length heavy chain sequence and a full length light chain sequence, wherein one or more of these sequences have specified amino acid sequences based on the antibodies described herein or conservative modifications thereof, and wherein the antibodies retain the desired functional properties of the LOX-1binding antibodies of the invention. Accordingly, the invention provides an isolated antibody optimized for expression in a mammalian cell consisting of a full length heavy chain and a full length light chain wherein the full length heavy chain has amino acid sequences selected from the group of SEQ ID NOs: 16, 36, 56, 76, or 96, and conservative modifications thereof; and the full length light chain has amino acid sequences selected from the group of SEQ ID NOs: 26, 46, 66, 86, or 106, and conservative modifications thereof; and the antibody specifically binds to LOX-1 (e.*g.*, human and cynomolgus monkey LOX-1).

Antibodies That Bind to the Same Epitope

The present invention provides antibodies that bind to the same epitope as the LOX-1 binding antibodies described in Table 1. Additional antibodies can therefore be identified based on their ability to compete (*e.g.*, to competitively inhibit the binding of, in a statistically significant manner) with other antibodies of the invention in LOX-1binding assays (such as those described in the Examples). The ability of a test antibody to inhibit the binding of antibodies of the present invention to a LOX-1 protein demonstrates that the test antibody can compete with that antibody for binding to LOX-1; such an antibody may, according to non-limiting theory, bind to the same or a related (*e.g.*, a structurally similar or spatially proximal) epitope on the LOX-1 protein as the antibody with which it competes. In a certain embodiment, the antibody that binds to the same epitope on LOX-1 as the antibodies of the present invention is a human monoclonal antibody. Such human monoclonal antibodies can be prepared and isolated as described herein. As used herein, an antibody "competes" for binding when the competing antibody inhibits LOX-1 binding of an antibody or antigen binding fragment of the invention by more than 50% (for example, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% or 99%) in the presence of an equimolar concentration of competing antibody.

In other embodiments the antibodies or antigen binding fragments of the invention bind the LOX-1 C terminus lectin-like domain (oxLDL binding domain), more specifically to an epitope comprising amino acid residues 228-246 from human LOX-1

(FRVRGAVSQTYPSGTCAYI; SEQ ID NO:3). In certain embodiments, the antibodies or antigen binding fragments of the invention bind an epitope on human LOX-1 comprising amino acid residues Arg229 and Arg231 of human LOX-1 (SEQ ID NO:1).

Engineered and Modified Antibodies

An antibody of the invention further can be prepared using an antibody having one or more of the VH and/or VL sequences shown herein 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 variable regions (*i. e.*, VH and/or VL), 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 grafting. Antibodies interact with target antigens predominantly through amino acid residues that are located in the six heavy and light chain complementarity determining regions (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 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, L. *et al.*, 1998 Nature 332:323-327; Jones, P. *et al.*, 1986 Nature 321:522-525; Queen, C. *et al.*, 1989 Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86:10029-10033; U.S. Patent No. 5,225,539 to Winter, and U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen *et al.*)

Accordingly, another embodiment of the invention pertains to an isolated antibody, or an antigen binding fragment thereof, comprising a heavy chain variable region comprising CDR1 sequences having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, and 88; CDR2 sequences having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, and 89; CDR3 sequences having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10, 30, 50, 70, and 90, respectively; and a light chain variable region having CDR1 sequences having an amino acid sequence selected from the group

consisting of SEQ ID NOs: 18, 38, 58, 78, and 98; CDR2 sequences having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, and 99; and CDR3 sequences consisting of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, and 100, respectively. Thus, such antibodies contain the VH and VL CDR sequences of monoclonal antibodies, yet may contain different framework sequences from these antibodies.

Such framework sequences can be obtained from public DNA databases or 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 world wide web at mrc- cpe.cam.ac.uk/vbase), as well as in Kabat, E. A., *et al.*, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.*, 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox, J. P. L. *et al.*, 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836; the contents of each of which are expressly incorporated herein by reference.

An example of framework sequences for use in the antibodies of the invention are those that are structurally similar to the framework sequences used by selected antibodies of the invention, *e.g.*, consensus sequences and/or framework sequences used by monoclonal antibodies of the invention. The VH CDR1, 2 and 3 sequences, and the VL CDR1, 2 and 3 sequences, can be grafted onto framework regions that have the identical sequence as that found in the germline immunoglobulin gene from which the framework sequence derive, 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.*, U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen et al). Frameworks that can be utilized as scaffolds on which to build the antibodies and antigen binding fragments described herein include, but are not limited to VH1A, VH1B, VH3, Vk1, Vl2, and Vk2. Additional frameworks are known in the art and may be found, for example, in the vBase data base on the world wide web at vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?&MMN_position=1:1.

Accordingly, an embodiment of the invention relates to isolated LOX-1binding antibodies, or antigen binding fragments thereof, comprising a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 14, 34, 54, 74, or 94, or an amino acid sequence having one, two, three, four or

five amino acid substitutions, deletions or additions in the framework region of such sequences, and further comprising a light chain variable region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 24, 44, 64, 84, or 104, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions in the framework region of such sequences.

Another type of variable region modification is to mutate amino acid residues within the VH and/or VL 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 binding, or other functional property of interest, can be evaluated in *in vitro* or *in vivo* assays as described herein and provided in the Examples. Conservative modifications (as discussed above) 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.

Accordingly, in another embodiment, the invention provides isolated LOX-1-binding antibodies, or antigen binding fragments thereof, consisting of a heavy chain variable region having a VH CDR1 region consisting of an amino acid sequence selected from the group having SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, and 88 or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, and 88; a VH CDR2 region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, and 89 or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, and 89; a VH CDR3 region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10, 30, 50, 70, and 90, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 10, 30, 50, 70, and 90; a VL CDR1 region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 18, 38, 58, 78, and 98, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 18, 38, 58, 78, and 98; a VL CDR2 region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, and 99, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, and 99; and a VL CDR3 region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, and 100, or an amino acid sequence having

one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, and 100.

Accordingly, in another embodiment, the invention provides isolated LOX-1-binding antibodies, or antigen binding fragments thereof, consisting of a heavy chain variable region having a VH CDR1 region consisting of an amino acid sequence selected from the group having SEQ ID NOs: 11, 31, 51, 71, and 91 or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 11, 31, 51, 71, and 91; a VH CDR2 region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 12, 32, 52, 72, and 92 or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 12, 32, 52, 72, and 92; a VH CDR3 region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 13, 33, 53, 73, and 93, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 13, 33, 53, 73, and 93; a VL CDR1 region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 21, 41, 61, 81, and 101, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 21, 41, 61, 81, and 101; a VL CDR2 region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 22, 42, 62, 82, and 102, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 22, 42, 62, 82, and 102; and a VL CDR3 region having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 23, 43, 63, 83, and 103, or an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 23, 43, 63, 83, and 103.

Grafting Antigen-binding Domains Into Alternative Frameworks or Scaffolds

A wide variety of antibody/ immunoglobulin frameworks or scaffolds can be employed so long as the resulting polypeptide includes at least one binding region which specifically binds to LOX-1. Such frameworks or scaffolds include the 5 main idiotypes of human immunoglobulins, or fragments thereof, and include immunoglobulins of other animal species, preferably having humanized aspects. Single heavy-chain antibodies such as those identified in camelids are of particular interest in this regard. Novel

frameworks, scaffolds and fragments continue to be discovered and developed by those skilled in the art.

In one aspect, the invention pertains to generating non-immunoglobulin based antibodies using non-immunoglobulin scaffolds onto which CDRs of the invention can be grafted. Known or future non-immunoglobulin frameworks and scaffolds may be employed, as long as they comprise a binding region specific for the target LOX-1protein. Known non-immunoglobulin frameworks or scaffolds include, but are not limited to, fibronectin (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), ankyrin (Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland), domain antibodies (Domantis, Ltd., Cambridge, MA, and Ablynx nv, Zwijnaarde, Belgium), lipocalin (Pieris Proteolab AG, Freising, Germany), small modular immuno-pharmaceuticals (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxybodies (Avidia, Inc., Mountain View, CA), Protein A (Affibody AG, Sweden), and affilin (gamma-crystallin or ubiquitin) (Scil Proteins GmbH, Halle, Germany).

The fibronectin scaffolds are based on fibronectin type III domain (*e.g.*, the tenth module of the fibronectin type III (10 Fn3 domain)). The fibronectin type III domain has 7 or 8 beta strands which are distributed between two beta sheets, which themselves pack against each other to form the core of the protein, and further containing loops (analogous to CDRs) which connect the beta strands to each other and are solvent exposed. There are at least three such loops at each edge of the beta sheet sandwich, where the edge is the boundary of the protein perpendicular to the direction of the beta strands (see US 6,818,418). These fibronectin-based scaffolds are not an immunoglobulin, although the overall fold is closely related to that of the smallest functional antibody fragment, the variable region of the heavy chain, which comprises the entire antigen recognition unit in camel and llama IgG. Because of this structure, the non-immunoglobulin antibody mimics antigen binding properties that are similar in nature and affinity to those of antibodies. These scaffolds can be used in a loop randomization and shuffling strategy *in vitro* that is similar to the process of affinity maturation of antibodies *in vivo*. These fibronectin-based molecules can be used as scaffolds where the loop regions of the molecule can be replaced with CDRs of the invention using standard cloning techniques.

The ankyrin technology is based on using proteins with ankyrin derived repeat modules as scaffolds for bearing variable regions which can be used for binding to different targets. The ankyrin repeat module is a 33 amino acid polypeptide consisting of two anti-parallel α-helices and a β-turn. Binding of the variable regions is mostly optimized by using ribosome display.

Avimers are derived from natural A-domain containing protein such as LRP-1. These domains are used by nature for protein-protein interactions and in human over 250 proteins are structurally based on A-domains. Avimers consist of a number of different "A-domain" monomers (2-10) linked via amino acid linkers. Avimers can be created that can bind to the target antigen using the methodology described in, for example, U.S. Patent Application Publication Nos. 20040175756; 20050053973; 20050048512; and 20060008844.

Affibody affinity ligands are small, simple proteins composed of a three-helix bundle based on the scaffold of one of the IgG-binding domains of Protein A. Protein A is a surface protein from the bacterium Staphylococcus aureus. This scaffold domain consists of 58 amino acids, 13 of which are randomized to generate affibody libraries with a large number of ligand variants (See *e.g.*, US 5,831,012). Affibody molecules mimic antibodies, they have a molecular weight of 6 kDa, compared to the molecular weight of antibodies, which is 150 kDa. In spite of its small size, the binding site of affibody molecules is similar to that of an antibody.

Anticalins are products developed by the company Pieris ProteoLab AG. They are derived from lipocalins, a widespread group of small and robust proteins that are usually involved in the physiological transport or storage of chemically sensitive or insoluble compounds. Several natural lipocalins occur in human tissues or body liquids. The protein architecture is reminiscent of immunoglobulins, with hypervariable loops on top of a rigid framework. However, in contrast with antibodies or their recombinant fragments, lipocalins are composed of a single polypeptide chain with 160 to 180 amino acid residues, being just marginally bigger than a single immunoglobulin domain. The set of four loops, which makes up the binding pocket, shows pronounced structural plasticity and tolerates a variety of side chains. The binding site can thus be reshaped in a proprietary process in order to recognize prescribed target molecules of different shape with high affinity and specificity. One protein of lipocalin family, the bilin-binding protein (BBP) of Pieris Brassicae has been used to develop anticalins by mutagenizing the set of four loops. One example of a patent application describing anticalins is in PCT Publication No. WO 199916873.

Affilin molecules are small non-immunoglobulin proteins which are designed for specific affinities towards proteins and small molecules. New affilin molecules can be very quickly selected from two libraries, each of which is based on a different human derived scaffold protein. Affilin molecules do not show any structural homology to immunoglobulin proteins. Currently, two affilin scaffolds are employed, one of which is

gamma crystalline, a human structural eye lens protein and the other is "ubiquitin" superfamily proteins. Both human scaffolds are very small, show high temperature stability and are almost resistant to pH changes and denaturing agents. This high stability is mainly due to the expanded beta sheet structure of the proteins. Examples of gamma crystalline derived proteins are described in WO200104144 and examples of "ubiquitin-like" proteins are described in WO2004106368.

Protein epitope mimetics (PEM) are medium-sized, cyclic, peptide-like molecules (MW 1-2kDa) mimicking beta-hairpin secondary structures of proteins, the major secondary structure involved in protein-protein interactions.

The present invention provides fully human antibodies that specifically bind to a LOX-1 protein. Compared to the chimeric or humanized antibodies, the human LOX-1-binding antibodies of the invention have further reduced antigenicity when administered to human subjects.

Camelid antibodies

Antibody proteins obtained from members of the camel and dromedary (Camelus bactrianus and Calelus dromaderius) family including new world members such as llama species (Lama paccos, Lama glama and Lama vicugna) have been characterized with respect to size, structural complexity and antigenicity for human subjects. Certain IgG antibodies from this family of mammals as found in nature lack light chains, and are thus structurally distinct from the typical four chain quaternary structure having two heavy and two light chains, for antibodies from other animals. See PCT/EP93/02214 (WO 94/04678 published 3 March 1994).

A region of the camelid antibody which is the small single variable domain identified as VHH 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 protein known as a "camelid nanobody". See U.S. patent number 5,759,808 issued June 2, 1998; see also Stijlemans, B. *et al.*, 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, M. *et al.*, 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M. *et al.* 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. *et al.* 2002 Int J Cancer 89: 456-62; and Lauwereys, M. *et al.* 1998 EMBO J 17: 3512-3520. Engineered libraries of camelid antibodies and antibody fragments 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.

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.*, camelid nanobodies are useful as reagents 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 facilitated drug transport across the blood brain barrier. See U.S. patent application 20040161738 published August 19, 2004. These features combined with the low antigenicity to humans indicate great therapeutic potential. Further, these molecules can be fully expressed in prokaryotic cells such as E. coli and are expressed as fusion proteins with bacteriophage and are functional.

Accordingly, a feature of the present invention is a camelid antibody or nanobody having high affinity for LOX-1. 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 LOX-1or a peptide fragment thereof, using techniques described herein for other antibodies. Alternatively, the LOX-1-binding 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 LOX-1 as a target as described in the examples herein. Engineered nanobodies can further be customized by genetic engineering to have a half life in a recipient subject of from 45 minutes to two weeks. In a specific embodiment, the camelid antibody or nanobody is obtained by grafting the CDRs sequences of the heavy or light

chain of the human antibodies of the invention into nanobody or single domain antibody framework sequences, as described for example in PCT/EP93/02214.

Bispecific Molecules and Multivalent Antibodies

In another aspect, the present invention features bispecific or multispecific molecules comprising a LOX-1-binding antibody, or a fragment thereof, of the invention. An antibody of the invention, or antigen-binding regions thereof, 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 binds to at least two different binding sites or target molecules. The antibody 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 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 LOX-1 and a second binding specificity for a second target epitope. For example, the second target epitope is another epitope of LOX-1 different from the first target epitope.

Additionally, for the invention in which the bispecific molecule is multi-specific, the molecule can further include a third binding specificity, in addition to the first and second target epitope.

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.*, a 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. Patent No. 4,946,778.

Diabodies are bivalent, bispecific molecules in which VH and VL 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 VH and VL 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 VHA-VLB and VHB-VLA (VH-VL configuration), or VLA-VHB and VLB-VHA (VL-VH 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-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; 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).

Other antibodies which can be employed in the bispecific molecules of the invention are murine, chimeric and humanized monoclonal antibodies.

Bispecific molecules 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 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) cyclohaxane-l-carboxylate (sulfo-SMCC) (see *e.g.*, Karpovsky *et al.*, 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA *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 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. Patent Number 5,260,203; U.S. Patent Number 5,455,030; U.S. Patent Number 4,881,175; U.S. Patent Number 5,132,405; U.S. Patent Number 5,091,513; U.S. Patent Number 5,476,786; U.S. Patent Number 5,013,653; U.S. Patent Number 5,258,498; and U.S. Patent Number 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.

In another aspect, the present invention provides multivalent compounds comprising at least two identical or different antigen-binding portions of the antibodies of the invention binding to LOX-1. The antigen-binding portions can be linked together via protein fusion or covalent or non covalent linkage. Alternatively, methods of linkage have been described for the bispecfic molecules. Tetravalent compounds can be obtained for example by cross-linking antibodies of the antibodies of the invention with an antibody that binds to the constant regions of the antibodies of the invention, for example the Fc or hinge region.

Trimerizing domain are described for example in Borean patent EP 1 012 280B1. Pentamerizing modules are described for example in PCT/EP97/05897.

Antibodies with Extended Half Life

The present invention provides for antibodies that specifically bind to LOX-1 protein which have an extended half-life *in vivo*.

Many factors may affect a protein's half life *in vivo*. For examples, kidney filtration, metabolism in the liver, degradation by proteolytic enzymes (proteases), and immunogenic responses (*e.g.*, protein neutralization by antibodies and uptake by macrophages and dendritic cells). A variety of strategies can be used to extend the half life of the antibodies of the present invention. For example, by chemical linkage to polyethyleneglycol (PEG), reCODE PEG, antibody scaffold, polysialic acid (PSA), hydroxyethyl starch (HES), albumin-binding ligands, and carbohydrate shields; by genetic fusion to proteins binding to serum proteins, such as albumin, IgG, FcRn, and transferring; by coupling (genetically or chemically) to other binding moieties that bind to serum proteins, such as nanobodies, Fabs, DARPins, avimers, affibodies, and anticalins; by genetic fusion to rPEG, albumin, domain of albumin, albumin-binding proteins, and Fc; or by incorporation into nanocarriers, slow release formulations, or medical devices.

To prolong the serum circulation of antibodies *in vivo*, inert polymer molecules such as high molecular weight PEG can be attached to the antibodies or a fragment thereof with or without a multifunctional linker either through site-specific conjugation of the PEG to the N- or C-terminus of the antibodies or via epsilon-amino groups present on lysine residues. 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 or more PEG groups 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- or aryloxy-polyethylene glycol or polyethylene glycol-maleimide. In certain embodiments, the antibody to be pegylated is an aglycosylated antibody. Linear or branched polymer derivatization that results in minimal loss of biological activity will be used. The degree of conjugation can be closely monitored by SDS-PAGE and mass spectrometry to ensure proper conjugation of PEG molecules to the antibodies. Unreacted PEG can be separated from antibody-PEG conjugates by size-exclusion or by ion-exchange chromatography. PEG-derivatized antibodies can be tested for binding activity as well as for *in vivo* efficacy using methods well-known to those of skill in the art, for example, by immunoassays described herein. 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.*

Other modified pegylation technologies include reconstituting chemically orthogonal directed engineering technology (ReCODE PEG), which incorporates chemically specified side chains into biosynthetic proteins via a reconstituted system that includes tRNA synthetase and tRNA. This technology enables incorporation of more than 30 new amino acids into biosynthetic proteins in E.coli, yeast, and mammalian cells. The tRNA incorporates a nonnative amino acid any place an amber codon is positioned, converting the amber from a stop codon to one that signals incorporation of the chemically specified amino acid.

Recombinant pegylation technology (rPEG) can also be used for serum halflife extension. This technology involves genetically fusing a 300-600 amino acid unstructured protein tail to an existing pharmaceutical protein. Because the apparent molecular weight of such an unstructured protein chain is about 15-fold larger than its actual molecular weight, the serum halflife of the protein is greatly increased. In contrast to traditional PEGylation, which requires chemical conjugation and repurification, the manufacturing process is greatly simplified and the product is homogeneous.

Polysialytion is another technology, which uses the natural polymer polysialic acid (PSA) to prolong the active life and improve the stability of therapeutic peptides and proteins. PSA is a polymer of sialic acid (a sugar). When used for protein and therapeutic peptide drug delivery, polysialic acid provides a protective microenvironment on conjugation. This increases the active life of the therapeutic protein in the circulation and prevents it from being recognized by the immune system. The PSA polymer is naturally found in the human body. It was adopted by certain bacteria which evolved over millions of years to coat their walls with it. These naturally polysialylated bacteria were then able, by virtue of molecular mimicry, to foil the body's defense system. PSA, nature's ultimate stealth technology, can be easily produced from such bacteria in large quantities and with predetermined physical characteristics. Bacterial PSA is completely non-immunogenic, even when coupled to proteins, as it is chemically identical to PSA in the human body.

Another technology includes the use of hydroxyethyl starch ("HES") derivatives linked to antibodies. HES is a modified natural polymer derived from waxy maize starch and can be metabolized by the body's enzymes. HES solutions are usually administered to substitute deficient blood volume and to improve the rheological properties of the blood. Hesylation of an antibody enables the prolongation of the circulation half-life by increasing the stability of the molecule, as well as by reducing renal clearance, resulting

in an increased biological activity. By varying different parameters, such as the molecular weight of HES, a wide range of HES antibody conjugates can be customized.

Antibodies having an increased half-life *in vivo* can also be generated introducing one or more amino acid modifications (*i.e.*, substitutions, insertions or deletions) into an IgG constant domain, or FcRn binding fragment thereof (preferably a Fc or hinge Fc domain fragment). See, *e.g.*, International Publication No. WO 98/23289; International Publication No. WO 97/34631; and U.S. Patent No. 6,277,375.

Further, antibodies can be conjugated to albumin (e.g., human serum albumin; HSA) in order to make the antibody or antibody fragment more stable *in vivo* or have a longer half life *in vivo*. The techniques are well-known in the art, see, *e.g.*, International Publication Nos. WO 93/15199, WO 93/15200, and WO 01/77137; and European Patent No. EP 413,622. In addition, in the context of a bispecific antibody as described above, the specificities of the antibody can be designed such that one binding domain of the antibody binds to LOX-1 while a second binding domain of the antibody binds to serum albumin, preferably HSA.

The strategies for increasing half life is especially useful in nanobodies, fibronectin-based binders, and other antibodies or proteins for which increased *in vivo* half life is desired.

Antibody Conjugates

The present invention provides antibodies or fragments thereof that specifically bind to a LOX-1 protein recombinantly fused or chemically conjugated (including both covalent and non-covalent conjugations) to a heterologous protein or polypeptide (or fragment thereof, preferably to a polypeptide of at least 10, at least 20, at least 30, at least 40, at least 50, at least 60, at least 70, at least 80, at least 90 or at least 100 amino acids) to generate fusion proteins. In particular, the invention provides fusion proteins comprising an antigen-binding fragment of an antibody described herein (*e.g.*, a Fab fragment, Fd fragment, Fv fragment, F(ab)2 fragment, a VH domain, a VH CDR, a VL domain or a VL CDR) and a heterologous protein, polypeptide, or peptide. Methods for fusing or conjugating proteins, polypeptides, or peptides to an antibody or an antibody fragment are known in the art. See, *e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851, and 5,112,946; European Patent Nos. EP 307,434 and EP 367,166; International Publication Nos. WO 96/04388 and WO 91/06570; Ashkenazi

et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng *et al.*, 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; and Vil *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341.

Additional fusion proteins may be generated through the techniques of gene-shuffling, motif-shuffling, exon-shuffling, and/or codon-shuffling (collectively referred to as "DNA shuffling"). DNA shuffling may be employed to alter the activities of antibodies of the invention or fragments thereof (*e.g.*, antibodies or fragments thereof with higher affinities and lower dissociation rates). See, generally, U.S. Patent Nos. 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252, and 5,837,458; Patten *et al.*, 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson, *et al.*, 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; and Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-313 (each of these patents and publications are hereby incorporated by reference in its entirety). Antibodies or fragments thereof, or the encoded antibodies or fragments thereof, may be altered by being subjected to random mutagenesis by error-prone PCR, random nucleotide insertion or other methods prior to recombination. A polynucleotide encoding an antibody or fragment thereof that specifically binds to a LOX-1 protein may be recombined with one or more components, motifs, sections, parts, domains, fragments, etc. of one or more heterologous molecules.

Moreover, the antibodies or fragments thereof can be fused to marker sequences, such as a peptide to facilitate purification. In preferred embodiments, the marker amino acid sequence is a hexa-histidine peptide, such as the tag provided in a pQE vector (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), among others, many of which are commercially available. As described in Gentz *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, for instance, hexa-histidine provides for convenient purification of the fusion protein. Other peptide tags useful for purification include, but are not limited to, the hemagglutinin ("HA") tag, which corresponds to an epitope derived from the influenza hemagglutinin protein (Wilson *et al.*, 1984, Cell 37:767), and the "flag" tag.

In other embodiments, antibodies of the present invention or fragments thereof conjugated to a diagnostic or detectable agent. Such antibodies can be useful for monitoring or prognosing the onset, development, progression and/or severity of a disease or disorder as part of a clinical testing procedure, such as determining the efficacy of a particular therapy. Such diagnosis and detection can accomplished by coupling the antibody to detectable substances including, but not limited to, various enzymes, such as, but not limited to, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase,

beta-galactosidase, or acetylcholinesterase; prosthetic groups, such as, but not limited to, streptavidinlbiotin and avidin/biotin; fluorescent materials, such as, but not limited to, umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocynate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; luminescent materials, such as, but not limited to, luminol; bioluminescent materials, such as but not limited to, luciferase, luciferin, and aequorin; radioactive materials, such as, but not limited to, iodine (131I, 125I, 123I, and 121I,), carbon (14C), sulfur (35S), tritium (3H), indium (115In, 113In, 112In, and 111In,), technetium (99Tc), thallium (201Ti), gallium (68Ga, 67Ga), palladium (103Pd), molybdenum (99Mo), xenon (133Xe), fluorine (18F), 153Sm, 177Lu, 159Gd, 149Pm, 140La, 175Yb, 166Ho, 90Y, 47Sc, 186Re, 188Re,142 Pr, 105Rh, 97Ru, 68Ge, 57Co, 65Zn, 85Sr, 32P, 153Gd, 169Yb, 51Cr, 54Mn, 75Se, 113Sn, and 117Tin; and positron emitting metals using various positron emission tomographies, and noradioactive paramagnetic metal ions.

The present invention further encompasses uses of antibodies or fragments thereof conjugated to a therapeutic moiety. An antibody or fragment thereof may be conjugated to a therapeutic moiety such as a cytotoxin, *e.g.*, a cytostatic or cytocidal agent, a therapeutic agent or a radioactive metal ion, *e.g.*, alpha-emitters. A cytotoxin or cytotoxic agent includes any agent that is detrimental to cells.

Further, an antibody or fragment thereof may be conjugated to a therapeutic moiety or drug moiety that modifies a given biological response. Therapeutic moieties or drug moieties are not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety may be a protein, peptide, or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, a toxin such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, cholera toxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor, α-interferon, β-interferon, nerve growth factor, platelet derived growth factor, tissue plasminogen activator, an apoptotic agent, an anti-angiogenic agent; or, a biological response modifier such as, for example, a lymphokine.

Moreover, an antibody can be conjugated to therapeutic moieties such as a radioactive metal ion, such as alph-emiters such as 213Bi or macrocyclic chelators useful for conjugating radiometal ions, including but not limited to, 131In, 131LU, 131Y, 131Ho, 131Sm, to polypeptides. In certain embodiments, the macrocyclic chelator is 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N",N"'-tetraacetic acid (DOTA) which can be attached to the antibody via a linker molecule. Such linker molecules are commonly known in the art and described in Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90;

Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; and Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, each incorporated by reference in their entireties.

Techniques for conjugating therapeutic moieties to antibodies are well known, see, *e.g.*, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58.

Antibodies may also be attached to solid supports, which are particularly useful for immunoassays or purification of the target antigen. Such solid supports include, but are not limited to, glass, cellulose, polyacrylamide, nylon, polystyrene, polyvinyl chloride or polypropylene.

Methods of Producing Antibodies of the Invention

Nucleic Acids Encoding the Antibodies

The invention provides substantially purified nucleic acid molecules which encode polypeptides comprising segments or domains of the LOX-1-binding antibody chains described above. Some of the nucleic acids of the invention comprise the nucleotide sequence encoding the heavy chain variable region shown in SEQ ID NO: 15, 35, 55, 75, or 95, and/or the nucleotide sequence encoding the light chain variable region shown in SEQ ID NO: 25, 45, 65, 85, or 105. In a specific embodiment, the nucleic acid molecules are those identified in Table 1. Some other nucleic acid molecules of the invention comprise nucleotide sequences that are substantially identical (*e.g.*, at least 65, 80%, 95%, or 99%) to the nucleotide sequences of those identified in Table 1. When expressed from appropriate expression vectors, polypeptides encoded by these polynucleotides are capable of exhibiting LOX-1antigen binding capacity.

Also provided in the invention are polynucleotides which encode at least one CDR region and usually all three CDR regions from the heavy or light chain of the LOX-1-binding antibody set forth above. Some other polynucleotides encode all or substantially all of the variable region sequence of the heavy chain and/or the light chain of the LOX-1-binding antibody set forth above. Because of the degeneracy of the code, a variety of nucleic acid sequences will encode each of the immunoglobulin amino acid sequences.

The nucleic acid molecules of the invention can encode both a variable region and a constant region of the antibody. Some of nucleic acid sequences of the invention comprise nucleotides encoding a heavy chain sequence that is substantially identical (*e.g.*, at least 80%, 90%, or 99%) to the heavy chain sequence set forth in SEQ ID NO: 16, 36, 56, 76, or 96. Some other nucleic acid sequences comprising nucleotide encoding a light chain sequence that is substantially identical (*e.g.*, at least 80%, 90%, or 99%) to the light chain sequence set forth in SEQ ID NO: 26, 46, 66, 86, or 106.

The polynucleotide sequences can be produced by de novo solid-phase DNA synthesis or by PCR mutagenesis of an existing sequence (*e.g.*, sequences as described in the Examples below) encoding a LOX-1-binding antibody or its binding fragment. Direct chemical synthesis of nucleic acids can be accomplished by methods known in the art, such as the phosphotriester method of Narang *et al.*, 1979, Meth. Enzymol. 68:90; the phosphodiester method of Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 68:109, 1979; the diethylphosphoramidite method of Beaucage *et al.*, Tetra. Lett., 22:1859, 1981; and the solid support method of U.S. Patent No. 4,458,066. Introducing mutations to a polynucleotide sequence by PCR can be performed as described in, *e.g.*, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.* (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila *et al.*, Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; and Eckert *et al.*, PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

Also provided in the invention are expression vectors and host cells for producing the LOX-1-binding antibodies described above. Various expression vectors can be employed to express the polynucleotides encoding the LOX-1-binding antibody chains or binding fragments. Both viral-based and nonviral expression vectors can be used to produce the antibodies in a mammalian host cell. Nonviral vectors and systems include plasmids, episomal vectors, typically with an expression cassette for expressing a protein or RNA, and human artificial chromosomes (see, *e.g.*, Harrington *et al.*, Nat Genet 15:345, 1997). For example, nonviral vectors useful for expression of the LOX-1-

binding polynucleotides and polypeptides in mammalian (*e.g.*, human) cells include pThioHis A, B & C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B & C, (Invitrogen, San Diego, CA), MPSV vectors, and numerous other vectors known in the art for expressing other proteins. Useful viral vectors include vectors based on retroviruses, adenoviruses, adenoassociated viruses, herpes viruses, vectors based on SV40, papilloma virus, HBP Epstein Barr virus, vaccinia virus vectors and Semliki Forest virus (SFV). See, Brent *et al.*, supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; and Rosenfeld *et al.*, Cell 68:143, 1992.

The choice of expression vector depends on the intended host cells in which the vector is to be expressed. Typically, the expression vectors contain a promoter and other regulatory sequences (*e.g.*, enhancers) that are operably linked to the polynucleotides encoding a LOX-1-binding antibody chain or fragment. In some embodiments, an inducible promoter is employed to prevent expression of inserted sequences except under inducing conditions. Inducible promoters include, *e.g.*, arabinose, lacZ, metallothionein promoter or a heat shock promoter. Cultures of transformed organisms can be expanded under noninducing conditions without biasing the population for coding sequences whose expression products are better tolerated by the host cells. In addition to promoters, other regulatory elements may also be required or desired for efficient expression of a LOX-1-binding antibody chain or fragment. These elements typically include an ATG initiation codon and adjacent ribosome binding site or other sequences. In addition, the efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of enhancers appropriate to the cell system in use (see, *e.g.*, Scharf *et al.*, Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; and Bittner *et al.*, Meth. Enzymol., 153:516, 1987). For example, the SV40 enhancer or CMV enhancer may be used to increase expression in mammalian host cells.

The expression vectors may also provide a secretion signal sequence position to form a fusion protein with polypeptides encoded by inserted LOX-1-binding antibody sequences. More often, the inserted LOX-1-binding antibody sequences are linked to a signal sequences before inclusion in the vector. Vectors to be used to receive sequences encoding LOX-1-binding antibody light and heavy chain variable domains sometimes also encode constant regions or parts thereof. Such vectors allow expression of the variable regions as fusion proteins with the constant regions thereby leading to production of intact antibodies or fragments thereof. Typically, such constant regions are human.

The host cells for harboring and expressing the LOX-1-binding antibody chains can be either prokaryotic or eukaryotic. E. coli is one prokaryotic host useful for cloning and expressing the polynucleotides of the present invention. Other microbial hosts suitable for use include bacilli, such as Bacillus subtilis, and other enterobacteriaceae, such as Salmonella, Serratia, and various Pseudomonas species. In these prokaryotic hosts, one can also make expression vectors, which typically contain expression control sequences compatible with the host cell (*e.g.*, an origin of replication). In addition, any number of a variety of well-known promoters will be present, such as the lactose promoter system, a tryptophan (trp) promoter system, a beta-lactamase promoter system, or a promoter system from phage lambda. The promoters typically control expression, optionally with an operator sequence, and have ribosome binding site sequences and the like, for initiating and completing transcription and translation. Other microbes, such as yeast, can also be employed to express LOX-1-binding polypeptides of the invention. Insect cells in combination with baculovirus vectors can also be used.

In some preferred embodiments, mammalian host cells are used to express and produce the LOX-1-binding polypeptides of the present invention. For example, they can be either a hybridoma cell line expressing endogenous immunoglobulin genes (*e.g.*, the 1D6.C9 myeloma hybridoma clone as described in the Examples) or a mammalian cell line harboring an exogenous expression vector (*e.g.*, the SP2/0 myeloma cells exemplified below). These include any normal mortal or normal or abnormal immortal animal or human cell. For example, a number of suitable host cell lines capable of secreting intact immunoglobulins have been developed including the CHO cell lines, various Cos cell lines, HeLa cells, myeloma cell lines, transformed B-cells and hybridomas. The use of mammalian tissue cell culture to express polypeptides is discussed generally in, *e.g.*, Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Expression vectors for mammalian host cells can include expression control sequences, such as an origin of replication, a promoter, and an enhancer (see, *e.g.*, Queen, *et al.*, Immunol. Rev. 89:49-68, 1986), and necessary processing information sites, such as ribosome binding sites, RNA splice sites, polyadenylation sites, and transcriptional terminator sequences. These expression vectors usually contain promoters derived from mammalian genes or from mammalian viruses. Suitable promoters may be constitutive, cell type-specific, stage-specific, and/or modulatable or regulatable. Useful promoters include, but are not limited to, the metallothionein promoter, the constitutive adenovirus major late promoter, the dexamethasone-inducible MMTV promoter, the SV40 promoter, the MRP polIII promoter, the constitutive MPSV promoter, the tetracycline-inducible CMV promoter (such as the human immediate-early

CMV promoter), the constitutive CMV promoter, and promoter-enhancer combinations known in the art.

Methods for introducing expression vectors containing the polynucleotide sequences of interest vary depending on the type of cellular host. For example, calcium chloride transfection is commonly utilized for prokaryotic cells, whereas calcium phosphate treatment or electroporation may be used for other cellular hosts. (See generally Sambrook, *et al.*, supra). Other methods include, *e.g.*, electroporation, calcium phosphate treatment, liposome-mediated transformation, injection and microinjection, ballistic methods, virosomes, immunoliposomes, polycation:nucleic acid conjugates, naked DNA, artificial virions, fusion to the herpes virus structural protein VP22 (Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997), agent-enhanced uptake of DNA, and ex vivo transduction. For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression will often be desired. For example, cell lines which stably express LOX-1-binding antibody chains or binding fragments can be prepared using expression vectors of the invention which contain viral origins of replication or endogenous expression elements and a selectable marker gene. Following the introduction of the vector, cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media before they are switched to selective media. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows growth of cells which successfully express the introduced sequences in selective media. Resistant, stably transfected cells can be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

Generation of monoclonal antibodies of the invention

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. Many techniques for producing monoclonal antibody can be employed *e.g.*, viral or oncogenic transformation of B lymphocytes.

Animal systems for preparing hybridomas include the murine, rat and rabbit systems. 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. Patent 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. Patent No. 5225539 to Winter, and U.S. Patent Nos. 5530101; 5585089; 5693762 and 6180370 to Queen *et al.*

In a certain embodiment, the antibodies of the invention are human monoclonal antibodies. Such human monoclonal antibodies directed against LOX-1can 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 IgGκ 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 at., 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. Patent 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. Patent No. 5,545,807 to Surani *et al.*; PCT Publication 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 Publication 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 transchomosomes 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 PCT Publication WO 02/43478 to Ishida *et al.*

Still further, alternative transgenic animal systems expressing human immunoglobulin genes are available in the art and can be used to raise LOX-1-binding 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. Patent 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 LOX-1-binding antibodies of the invention. For example, mice carrying both a human heavy chain transchromosome and a human light chain tranchromosome, 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 LOX-1-binding 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 or described in the examples below. See for example: U.S. Patent Nos. 5,223,409; 5,403,484; and 5,571,698 to Ladner *et al.*; U.S. Patent Nos. 5,427,908 and 5,580,717 to Dower *et al.*; U.S. Patent Nos. 5,969,108 and 6,172,197 to McCafferty *et al.*; and U.S. Patent Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 and 6,593,081 to Griffiths *et al.*

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. Patent Nos. 5,476,996 and 5,698,767 to Wilson *et al.*

Framework or Fc engineering

Engineered antibodies of the invention include those in which modifications have been made to framework residues within VH and/or VL, *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. 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. Patent Publication 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. Each of these embodiments is described in further detail below. The numbering of residues in the Fc region is that of the EU index of Kabat.

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 approach is described further in U.S. Patent 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.

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 Staphylococcyl protein A (SpA) binding relative to native Fc-hinge domain SpA binding. This approach is described in further detail in U.S. Patent No. 6,165,745 by Ward *et al.*

In another embodiment, the antibody is modified to increase its biological half-life. Various approaches are possible. For example, one or more of the following mutations can be introduced: T252L, T254S, T256F, as described in U.S. Patent No. 6,277,375 to Ward. 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. Patent Nos. 5,869,046 and 6,121,022 by Presta *et al.*

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. Patent Nos. 5,624,821 and 5,648,260, both by Winter *et al.*

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. Patent Nos. 6,194,551 by Idusogie *et al.*

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 PCT Publication WO 94/29351 by Bodmer *et al.*

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 PCT Publication WO 00/42072 by Presta. 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. Chen. 276:6591-6604).

In still another embodiment, the glycosylation of an antibody is modified. For example, an aglycoslated antibody can be made (*i.e.*, the antibody lacks glycosylation). Glycosylation can be altered to, for example, increase the affinity of the antibody for "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 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. Patent 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 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 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 Publication WO 03/035835 by Presta describes a variant CHO cell line, Lecl3 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). PCT Publication WO 99/54342 by Umana *et al.* describes cell lines engineered to express glycoprotein-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).

Methods of Engineering Altered Antibodies

As discussed above, the LOX-1-binding antibodies having VH and VL sequences or full length heavy and light chain sequences shown herein can be used to create new LOX-1-binding antibodies by modifying full length heavy chain and/or light chain sequences, VH and/or VL sequences, or the constant region(s) attached thereto. Thus, in another aspect of the invention, the structural features of a LOX-1-binding antibody of the invention are used to create structurally related LOX-1-binding antibodies that retain at least one functional property of the antibodies of the invention, such as binding to human LOX-1and also inhibiting one or more functional properties of LOX-1 (*e.g.*, inhibit LOX-1binding to the LOX-1receptor, inhibit LOX-1-dependent cell proliferation).

For example, one or more CDR regions of the antibodies of the present invention, or mutations thereof, can be combined recombinantly with known framework regions and/or other CDRs to create additional, recombinantly-engineered, LOX-1-binding antibodies of the invention, as discussed above. Other types of modifications include those described in the previous section. The starting material for the engineering method is one or more of the VH and/or VL sequences provided herein, 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 VH and/or VL sequences provided herein, 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.

Accordingly, in another embodiment, the invention provides a method for preparing a LOX-1-binding antibody consisting of a heavy chain variable region antibody sequence having a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 8, 28, 48, 68, and 88, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 9, 29, 49, 69, and 89, and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10, 30, 50, 70, and 90; and a light chain variable region antibody sequence having a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 18, 38, 58, 78, and 98, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 19, 39, 59, 79, and 99, and/or a CDR3 sequence selected from the group

consisting of SEQ ID NOs: 20, 40, 60, 80, and 100; altering at least one amino acid residue within the heavy chain variable region antibody sequence and/or the light chain variable region antibody sequence to create at least one altered antibody sequence; and expressing the altered antibody sequence as a protein.

Accordingly, in another embodiment, the invention provides a method for preparing a LOX-1-binding antibody consisting of a heavy chain variable region antibody sequence having a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 11, 31, 51, 71, and 91, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 12, 32, 52, 72, and 92, and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 13, 33, 53, 73, and 93; and a light chain variable region antibody sequence having a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 21, 41, 61, 81, and 101, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 22, 42, 62, 82, and 102, and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 23, 43, 63, 83, and 103; altering at least one amino acid residue within the heavy chain variable region antibody sequence and/or the light chain variable region antibody sequence to create at least one altered antibody sequence; and expressing the altered antibody sequence as a protein.

Accordingly, in another embodiment, the invention provides a method for preparing a LOX-1-binding antibody optimized for expression in a mammalian cell consisting of: a full length heavy chain antibody sequence having a sequence selected from the group of SEQ ID NOs: 16, 36, 56, 76, or 96; and a full length light chain antibody sequence having a sequence selected from the group of 26, 46, 66, 86, or 106; altering at least one amino acid residue within the full length heavy chain antibody sequence and/or the full length light chain antibody sequence to create at least one altered antibody sequence; and expressing the altered antibody sequence as a protein. In one embodiment, the alteration of the heavy or light chain is in the framework region of the heavy or light chain.

The altered antibody sequence can also be prepared by screening antibody libraries having fixed CDR3 sequences or minimal essential binding determinants as described in US2005/0255552 and diversity on CDR1 and CDR2 sequences. The screening can be performed according to any screening technology appropriate for screening antibodies from antibody libraries, such as phage display technology.

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 LOX-1-binding antibodies described herein, which functional properties include, but are not limited to, specifically binding to human, cynomolgus, rat, and/or mouse LOX-1; and the antibody inhibit LOX-1-dependent cell proliferation in a F36E and/or Ba/F3-LOX-1R cell proliferation assay.

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 LOX-1-binding antibody coding sequence and the resulting modified LOX-1-binding antibodies can be screened for binding activity and/or other functional properties as described herein. Mutational methods have been described in the art. For example, PCT Publication WO 02/092780 by Short describes methods for creating and screening antibody mutations using saturation mutagenesis, synthetic ligation assembly, or a combination thereof. Alternatively, PCT Publication WO 03/074679 by Lazar *et al.* describes methods of using computational screening methods to optimize physiochemical properties of antibodies.

In certain embodiments of the invention antibodies have been engineered to remove sites of deamidation. Deamidation is known to cause structural and functional changes in a peptide or protein. Deamindation can result in decreased bioactivity, as well as alterations in pharmacokinetics and antigenicity of the protein pharmaceutical. (*Anal Chem.* 2005 Mar 1;77(5):1432-9).

In certain embodiments of the invention the antibodies have been engineered to increase pI and inprove their drug-like properties. The pI of a protein is a key determinant of the overall biophysical properties of a molecule. Antibodies that have low pIs have been known to be less soluble, less stable, and prone to aggregation. Further, the purification of antibodies with low pI is challenging and can be problematic especially during scale-up for clinical use. Increasing the pI of the anti-LOX-1antibodies, or Fabs, of the invention improved their solubility, enabling the antiboides to be formulated at higher concentrations (>100 mg/ml). Formulation of the antibodies at high concentrations (e.g. >100mg/ml) offers the advantage of being able to administer higher doses of the antibodies into eyes of patients via intravitreal injections, which in turn may enable reduced dosing frequency, a significant advantage for treatment of chronic diseases including cardiovascular disorderss. Higher pIs may also increase the FcRn-mediated recycling of the IgG version of the antibody thus enabling the drug to persist in the body for a longer duration, requiring fewer injections. Finally, the overall stability of the

antibodies is significantly improved due to the higher pI resulting in longer shelf-life and bioactivity *in vivo*. Preferably, the pI is greater than or equal to 8.2.

The functional properties of the altered antibodies can be assessed using standard assays available in the art and/or described herein, such as those set forth in the Examples (*e.g.*, ELISAs).

Prophylactic and Therapeutic Uses

Antibodies that binds LOX-1 as described herein, can be used at a therapeutically useful concentration for the treatment of a disease or disorder associated with increased LOX-1 levels and/or activity by administering to a subject in need thereof an effective amount of the antibodies or antigen binding fragments of the invention. The present invention provides a method of treating LOX-1-associated cardiovascular disorders by administering to a subject in need thereof an effective amount of the antibodies of the invention. The present invention provides a method of treating LOX-1-associated cardiovascular disorders by administering to a subject in need thereof an effective amount of the antibodies of the invention.

The antibodies of the invention can be used, *inter alia*, to prevent treat, prevent, and improve LOX-1 associated conditions or disorders, including but not limited to cardiovascular disorders, endothelial cell dysfunction, endothelial cell disorders, atherosclerosis, arteriosclerosis, hypertension, hyperlipidemia, hypercholesterolemia, diabetes mellitus, nitric oxide deficiency, myocardial infarction, vascular oxidative stress, myocardial ischemia, ischemia-reperfusion, sepsis, diabetic nephropathy, renal disease, cardiomyopathy, heart failure, peripheral artery disease, coronary heart disease, claudication (e.g., intermittent claudication, Rutherford Class II/III Claudication), peripheral artery disease (PAD), angina (e.g., refractory angina), coronary artery disease (CAD)(e.g., due to atherosclerosis of the arteries feeding the heart), stroke, and abnormal endothelium-dependent vasodilation.

Treatment and/or prevention of cardiovascular disorders, e.g., LOX-1-associated cardiovascular disorders, can be determined by a health care professional using clinically relevant measurements of vascular function. Treatment of LOX-1-associated cardiovascular disorders means any action (e.g., administration of an anti-LOX-1 antibody described herein) that results in, or is contemplated to result in, the improvement or preservation of vascular function, vascular anatomy and/or

hemodynamic parameters. In addition, prevention as it relates to conditions or disorders associated with cardiovascular disorders means any action (e.g., administration of an anti-LOX-1 antibody described herein) that prevents or slows a worsening in vascular function, and/or a cardiovascular disorders parameter, as defined herein, in a patient at risk for said worsening.

As oxLDLs and soluble LOX-1 levels are both increased in stable angina and acute ischemic syndromes, the anti-LOX-1 antibodies of the invention are expected to inhibit vascular oxidative stress, reduce myocardial ischemia and improve angina and exercise tolerance; said antibodies have the potential to become the first disease-modifying anti-anginal treatment available.

The efficacy of said therapeutic administration may be measured by a serial assessment of of frequency and duration of transient ischemic events (ambulatory ECG monitoring) and angina (Seattle angina questionnaire), and serial exercise tolerance testing with perfusion imaging option. Efficacy may also be measured by use of biomarkers such as plasma oxLDL, soluble LOX-1, and oxidative stress biomarkers (F2-isoprostanes, malondialdehyde, myeloperoxidase).

"Claudication," as used herein, includes severe claudication and other like terms, and describes a mobility impairment and high unmet medical need. Claudication is a condition characterized by lower extremity ischemia, causing muscle fatigue, pain on exertion relieved by rest, limited mobility, and reduced quality of life, and is caused by atherosclerosis and abnormal (e.g., impaired) endothelium-dependent vasodilation. Its prevalence in the US is 8-12 million patients. Among patients with intermittent claudication, 7% will undergo lower extremity bypass surgery, 4% will require major amputations, and 16% will develop worsening claudication. Cardiovascular events, such as myocardial infarction and stroke, occur in 20% of severe claudication sufferers over 5 years. The current therapy is surgical, and treatment through less invasive means, such as the administration of the anti-LOX-1 antibodies of the invention, would represent an enormous therapeutic breakthrough.

The efficacy of said therapeutic administration may be measured by a serial assessment of exercise-induced claudication (plantar flexion and treadmill), with endpoints to include time to onset of pain, excercise duration, and walking distance. Efficacy may also be measured by use of mechanistic biomarkers such as plasma oxLDL and soluble LOX-1; oxidative stress biomarkers (F2-isoprostanes,

malondialdehyde, myeloperoxidase); exercise-induced changes in lower extremity flow and muscle O2 saturation.

Another high unmet medical need for which the anti-LOX-1 antibodies of the invention would be therapeutically useful is refractory angina. Angina recurs in afflicated subjects despite optimum medical therapy (e.g., adminiatration of long acting beta-blocker, nitrate, and calcium channel blocker), with no option for revascularization. Refractory angina is a condition marked by chest pain due to ischemia of the heart muscle, generally due to obstruction or spasm of the coronary arteries (e.g., from coronary artery disease), with debilitating symptoms, very limited physical activity and poor quality of life. The 1-1.8 million patients refractory angina sufferers in the US experience increased cardiovascular mortality at a rate of 10% per year; at least 100,000 new refractory angina cases arise per year.

The antibodies of the invention can also be used in combination with other agents for the prevention, treatment, or improvement of LOX-1 associated disorders. For example, statin therapies may be used in combination with the LOX-1 antibodies and antigen binding fragments of the invention for the treatment of patients with cardiovascular disorders.

Pharmaceutical Compositions

The invention provides pharmaceutical compositions comprising the LOX-1-binding antibodies (intact or binding fragments) formulated together with a pharmaceutically acceptable carrier. The compositions can additionally contain one or more other therapeutic agents that are suitable for treating or preventing, for example, cardiovascular disorders. Pharmaceutically acceptable carriers enhance or stabilize the composition, or can be used to facilitate preparation of the composition. Pharmaceutically acceptable carriers include solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible.

A pharmaceutical composition of the present invention can be administered by a variety of methods known in the art. The route and/or mode of administration vary depending upon the desired results. It is preferred that administration be intravitreal, intravenous, intramuscular, intraperitoneal, or subcutaneous, or administered proximal to the site of the target. The pharmaceutically acceptable carrier should be suitable for

intravitreal, intravenous, intramuscular, subcutaneous, parenteral, spinal or epidermal administration (*e.g.*, by injection or infusion). Depending on the route of administration, the active compound, *i.e.*, antibody, bispecific and multispecific molecule, may be coated in a material to protect the compound from the action of acids and other natural conditions that may inactivate the compound.

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

Pharmaceutical compositions of the invention can be prepared in accordance with methods well known and routinely practiced in the art. See, *e.g.*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; and Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Pharmaceutical compositions are preferably manufactured under GMP conditions. Typically, a therapeutically effective dose or efficacious dose of the LOX-1-binding antibody is employed in the pharmaceutical compositions of the invention. The LOX-1-binding antibodies are formulated into pharmaceutically acceptable dosage forms by conventional methods known to those of skill in the art. Dosage regimens are adjusted to provide the 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 treated; each unit contains a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier.

Actual dosage levels of the active ingredients in the pharmaceutical compositions of the present invention can be varied so as to obtain an amount of the active ingredient which is effective to achieve the desired therapeutic response for a particular patient, composition, and mode of administration, without being toxic to the patient. The selected dosage level depends upon a variety of pharmacokinetic factors including the activity of

the particular compositions of the present invention employed, or the ester, salt or amide thereof, the route of administration, the time of administration, the rate of excretion of the particular compound being employed, the duration of the treatment, other drugs, compounds and/or materials used in combination with the particular compositions employed, the age, sex, weight, condition, general health and prior medical history of the patient being treated, and like factors.

A physician or veterinarian can start doses of the antibodies of the invention employed in the pharmaceutical composition at levels lower than that required to achieve the desired therapeutic effect and gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. In general, effective doses of the compositions of the present invention, for the treatment of a cardiovascular disorders described herein vary depending upon many different factors, including means of administration, target site, physiological state of the patient, whether the patient is human or an animal, other medications administered, and whether treatment is prophylactic or therapeutic. Treatment dosages need to be titrated to optimize safety and efficacy. For systemic administration with an antibody, the dosage ranges from about 0.0001 to 100 mg/kg, and more usually 0.01 to 15 mg/kg, of the host body weight. For intravitreal administration with an antibody, the dosage may range from 0.1 mg/eye to 5mg/eye. For example, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.7 mg/ml, 0.8 mg/ml, 0.9 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.1 mg/ml, 1.2 mg/ml, 1.3 mg/ml, 1.4 mg/ml, 1.5 mg/ml, 1.6 mg/ml, 1.7 mg/ml, 1.8 mg/ml, 1.9 mg/ml, 2.0 mg/ml, 2.1 mg/ml, 2.2 mg/ml, 2.3 mg/ml, 2.4 mg/ml, 2.5 mg/ml, 2.6 mg/ml, 2.7 mg/ml, 2.8 mg/ml, 2.9 mg/ml, 3.0 mg/ml, 3.1 mg/ml, 3.2 mg/ml, 3.3 mg/ml, 3.4 mg/ml, 3.5 mg/ml, 3.6 mg/ml, 3.7 mg/ml, 3.8 mg/ml, 3.9 mg/ml, 4.0 mg/ml, 4.1 mg/ml, 4.2 mg/ml, 4.3 mg/ml, 4.4 mg/ml, 4.5 mg/ml, 4.6 mg/ml, 4.7 mg/ml, 4.8 mg/ml, 4.9 mg/ml, or 5.0 mg/ml. An exemplary treatment regime entails systemic administration once per every two weeks or once a month or once every 3 to 6 months. An exemplary treatment regime entails systemic administration once per every two weeks or once a month or once every 3 to 6 months, or as needed (PRN).

Antibody is usually administered on multiple occasions. Intervals between single dosages can be weekly, monthly or yearly. Intervals can also be irregular as indicated by measuring blood levels of LOX-1-binding antibody in the patient. In addition alternative dosing intervals can be determined by a physician and administered monthly or as necessary to be efficacious. In some methods of systemic administration, dosage is adjusted to achieve a plasma antibody concentration of 1–1000 μg/ml and in some methods 25–500 μg/ml. Alternatively, antibody can be administered as a sustained release formulation, in which case less frequent administration is required. Dosage and

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

EXAMPLES

The following examples are provided to further illustrate the invention but not to limit its scope. Other variants of the invention will be readily apparent to one of ordinary skill in the art and are encompassed by the appended claims.

Example 1: Preparation of Purified Recombinant Human Soluble LOX-1 For Use as an Antigen

A nucleic acid sequence encoding the extracellular domain (amino acid residues 61-273) of human LOX-1 polypeptide with N-terminal signal peptide from human CD33, purification tag (EFHR), and BirA biotinylation sequence (GLNDIFEAQKIEWHE) (SEQ ID NO 144) was subcloned into the mammalian cell expression vector pRS5a. The resulting plasmid, pRS5a_APP-Avi-human-sLOX-1(61-273), was transiently transfected into HEK293T cells using standard polyethylenimine (PEI) transfection methods. Cells were propagated in suspension culture in Novartis medium M11V3 (Bioconcept) and transfection was carried out at 1.4×10^6 cells/ml final cell concentration in 5 liters media using a Wave Bioreactor.

Five hours after transfection, 5 liters of ExCell VPRO serum-free media (Sigma) was added. Cells were grown at 37 °C and 5% CO_2 for 10 days. Cells were then harvested by centrifugation, followed by filtration with a 0.22 micron sterile filter. The clarified supernatant was passed over a 20 mL anti-APP affinity resin (Novartis proprietary) equilibrated with PBS. The column was washed with PBS until baseline absorbance at 280 nm was reached. The column was then washed with 10 column volumes of PBS containing 1% Triton X-100 and 0.3% tri-n-butylphosphate, followed by

25 column volumes PBS. The sLOX-1 protein was then eluted with 50 mM sodium citrate, pH 3.0, and the fractions were neutralized with 1/10th volume of 1M Tris, pH 9.0. Relevant fractions were pooled and exhaustively dialyzed against PBS, then aliquoted and flash frozen in liquid nitrogen. Analytical sizing analysis showed the purified soluble LOX-1 protein material to be >95% dimer form, which is the expected form of this protein.

Example 2: Preparation of Human LOX-1 Transfected HEK293 Cells

To test the binding specificity and functional activity of anti-LOX1 specific antibodies, HEK293 cells stably overexpressing human LOX-1 were generated. Using standard Lipofectamine 2000 transfection methods, HEK293-6E cells were transfected with a mammalian expression plasmid encoding full-length human LOX-1 cDNA and hygromycin resistance. Transfected cultures were evaluated for surface expression of LOX-1 by flow cytometry on day three post transfection and then subjected to hygromycin selection (200 μg/ml) to enrich for stably expressing cells. Clonal populations were obtained by two sequential rounds of limiting dilution and expression was confirmed by flow cytometry. Only clones maintaining stable LOX-1 expression for more than four weeks in culture were selected and used in subsequent antibody characterization assays.

Example 3: Preparation of Monoclonal Antibodies

Recombinant human LOX-1 protein was prepared in-house as described in Example 1, and was used as immunogen for the generation of anti-LOX-1 hybridoma clones. The LOX-1 antigen in PBS was mixed with an equal volume of Freund's adjuvant to enhance the immune response in Balb/c mice. A complete Freund's adjuvant (Sigma F5881) was used for the first injection and an incomplete Freund's adjuvant (Sigma F5506) for the subsequent immunizations.

Animal immunizations and sample collection were carried out according to the IACUC-approved standard animal use protocols. Briefly, female Balb/c VAF mice at the age of 5-6 weeks (Charles River Laboratories) were immunized with the antigen emulsion of human LOX-1 protein and adjuvant. The mice were subcutaneously immunized for 4 times with approximately 20 μg protein in 100 μL of the antigen-adjuvant

mixture per animal. The injections were performed every 2-3 weeks to develop immune responses in the animals. Three days before cell fusion for the hybridoma generation, the mice were intraperitoneally boosted one more time with the same dose of LOX-1 antigen mixed with incomplete Freund's adjuvant, and were sacrificed for the spleen collection under sterilized surgical conditions on the day of cell fusion.

Spleens from the immunized mice were ground between two sterile and frosted microscopic slides to prepare for single cell suspension in RPMI-1640 medium. The spleen cells were pelleted and washed twice with RPMI-1640 medium. For cell fusions to generate hybridoma clones, the splenocytes were mixed and fused with murine myeloma P3X63Ag8.653 cells (Kearney J.F. et al., 1979. J. Immunol., 123:1548-1550) using polyethylene glycol-1500 as fusogen according to standard fusion protocols (Zhang C. 2012. Methods Mol. Biol. 901:117-135). Following cell fusions and centrifugation, the cells were suspended in complete RPMI-1640 medium (200mL/spleen) containing hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) supplement (Sigma H-0262), and were plated into 96-well flat-bottom plates (Corning-Costar 3596) at 200µL of cell suspension per well.

Following incubation at 37° C, 5% CO2 for 3-4 days, 100 µL of culture supernatant were removed from each well of the plates and replaced with an equal volume of complete RPMI-1640 medium containing hypoxanthine-thymidine (HT) supplement (Sigma H-0137). The plates continued to be incubated in an atmosphere of 5% CO2 at 37°C until hybridoma clones had grown large enough colonies to enable antibody screening.

Example 4: Hybridoma Screening, Subcloning and Selection

On week 2 post-fusion, when hybridoma cells had grown to be half-confluent in the plate wells and the supernatant had changed to an orange color, hybridoma supernatants were sampled from the plates for antibody screening by immunoassays, such as immunofluorescence flow cytometry for cell-based LOX-1 antigens or ELISA for LOX-1 protein antigen. For primary screening, hybridoma supernatants were tested by flow cytometry using LOX-1-transfected 293-6E cells versus non-transfected cells. Briefly, human LOX-1-transfected 293-6E cells, or the non-transfected cells, were respectively incubated with 50 µL of hybridoma supernatant, followed by labeling with fluorescein-AffiniPure Fab fragment goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate (Jackson

ImmunoResearch Laboratories), and analyzed by flow cytometry with Becton Dickinson FACSCalibur in an automatic mode.

By flow cytometric analysis, hybridoma clones that reacted with LOX-1-transfected 293-6E cells but not with non-transfected cells were identified and selected from fusion plates. The desired hybridoma clones were expanded in T12 plates for further characterization. Hybridoma clone of interest was subcloned by limiting dilution and microscopically picking single colonies to attain a monoclonal population that produces a LOX-1-specific monoclonal antibody. The selected hybridoma subclones were expanded in T12 plates and frozen for cryopreservation or used for monoclonal antibody production. The isotypes of specific monoclonal antibodies derived from hybridoma clones was determined by using commercially-available isotyping reagents.

On the basis of screening results, a panel of 24 human LOX-1-specific hybridoma clones was identified and selected from the immunization of mice with human LOX-1 antigen. One of these hybridoma clones, Clone 39.1E2E10 (abbreviated as E2E10, and herein referred to as E2E10 or murine parental), produced a monoclonal antibody of IgG1 with a kappa light chain, and was selected as one of the lead candidates for antibody sequencing and humanization based on its LOX-1 binding properties.

Example 5: Screening of Monoclonal Antibodies for Inhibition of OxLDL Binding to LOX-1

LOX-1 antibodies were purified from hybridoma supernatants using standard methods (e.g., Protein A affinity chromatography).

Purified APP-Avi-soluble human soluble LOX-1(61-273) protein prepared as decribed in Example 1 was biotinylated as follows: purified soluble LOX-1 protein (8-10 mg) in 50 mM Bicine pH 8.3 buffer at a final concentration of approximately 1 mg/mL was incubated in the presence of 10 mM ATP, 10 mM magnesium acetate, 0.1 mM biotin, and BirA biotin ligase (Avidity) at 30 °C for 1 hr and then placed at 4 °C overnight. The protein was then purified using a S200 Superdex 16/60 column equilibrated with PBS. Relevant fractions were pooled and the protein was concentrated to approximately 1 mg/mL concentration, aliquoted, and flash frozen in liquid nitrogen. Percent biotinylation was assessed by mass spectrometry peptide mapping of unbiotinylated and biotinylated samples. Typically, the biotinylation yield was >95%, and unbiotinylated material was

not detected. Analytical sizing analysis showed the biotinylated material to be 100% dimer form, which is the expected form of this protein.

The biotinylated soluble LOX-1 protein was then diluted to 2.5 μg/mL concentration in PBS, and 0.1 mL of this solution was added to wells of a NeutrAvidin 96-well plate (Pierce catalog number 15128), and the plate was then incubated overnight at 4 °C. The plate was washed three times with PBS, and then blocked by adding 0.3 mL per well of 25% Block Ace (AbD Serotec catalog number BUF029) and incubating the plate at room temperature for 2 hours with gentle shaking. The plate was then washed once with PBS. Serial dilutions of LOX-1 antibodies diluted in 1%BSA/PBS were prepared, and 0.1 mL of diluted antibodies added to the plate. The plate was incubated for 1 hour at room temperature, then washed three times with PBS. Next, 0.1 mL of oxLDL (high binding OxLDL, Kalen Biomedical catalog number 770212-7) diluted in 1%BSA/PBS to a final concentration of 2 ug/mL.

To generate an oxLDL standard curve, various concentrations of oxLDL were tested in the absence of LOX-1 antibody, using a top concentration of 20 ug/mL oxLDL. The plate was then incubated for 2 hours at room temperature, and the plate then washed three times with PBS. 0.1 mL/well of HRP-conjugated anti-ApoB100 antibody (The Binding Site, Inc., catalog number PP086) diluted 1:1000 in 1% BSA/PBS was then added, and incubated for 2 hours at room temperature. The plate was washed 6 times with PBS. 0.1 mL/well TMB substrate was then added and the plate was incubated for 10 minutes at room temperature. Stop solution (2N sulfuric acid, 50 μL/well) was added to each well, and the optical absorbance at 450 nm measured using an appropriate plate reader.

Example 6: Humanization of Monoclonal Antibodies

Mouse monoclonal antibody E2E10 was Humaneered™ to bring its protein sequence closer to a human germline sequence and decrease its immunogenicity. Humaneering™ technology is available through KaloBios of South San Francisco. Antibody Humaneering™ generates engineered human antibodies with V-region sequences that have high homology to a human germline sequence while still retaining the specificity and affinity of the parent or reference antibody (U.S. Patent Publ. 2005/0255552 and 2006/0134098). The process first identifies the minimum antigen binding specificity determinants (BSDs) in the heavy and light chain variable regions of a

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

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

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

Heavy and light chain compositions of Humaneered™ LOX-1 antibodies FF1, FF3, FF4, FF5, and FF6, and their percent similarity to the closest human germline sequence are shown in Table 2.

Table 2. Heavy and Light Chain Compositions of LOX-1 Antibodies and Percent Similarity to Closest Human Germline Sequence (HC = heavy chain, LC = light chain)

Fab	HC	HC % Vh1-O2	LC	LC % Vk1-L5
FF1	28+Tested	90	28Lc	94

FF3	28+All	92	28Lc	94
FF4	28+All	92	21Lc	93
FF5	28+All	92	62lc	90
FF6	28+All	92	62Lc	90

Example 7: LOX-1 Antibody Inhibition of OxLDL Binding to LOX-1 Protein

The ability of LOX-1 antibodies to inhibit oxLDL binding to LOX-1 protein was determined using the method described in Example 4. In addition to "high binding OxLDL" from Kalen Biomedical (catalog number 770212-7), which is generated by copper sulfate mediated oxidation of LDL, two other forms of modified LDL were tested in this assay: malondialdehyde modified LDL (Academy Bio-Medical Co. catalog number 20P-MD-L105) and hypochlorite modified LDL. Hypochlorite modified LDL was prepared according to the following procedure. Human LDL (Kalen Biomedical catalog number 770200-4) was diluted with PBS to a final concentration of 0.25 mg/mL. Sodium hypochlorite (NaOCl, JT Baker catalog number 9416-01) was then added to 0.1 mM final concentration. The solution was incubated at room temperate for 4 hours, then quenched by adding L-methionine to a final concentration of reaction by adding 5 µl of 100 mM Mehionine per 200 µl total volume. Representative data showing inhibition of modified LDL binding to LOX-1 by LOX-1 antibodies is shown in Figures 1A-1C, and described in Table 3.

Table 3: LOX-1 Antibody Inhibition of OxLDL Binding to LOX-1 Protein (table with IC50 values).

	LLG783 (FF1)	LLG785 (FF3)	LLG786 (FF4)	LLG787 (FF5)	LLG788 (FF6)	E2E10 (murine parental)

Inhibition of huLOX-1 binding to copper-sulfate-oxidized LDL (IC_{50}, nM)	7	8	8	10	12	6
Inhibition of huLOX-1 binding to malon-dialdehyde-modified LDL (IC_{50}, nM)	15	14	14	17	18	13
Inhibition of huLOX-1 binding to hypochlorite modified LDL (IC_{50}, nM)	4	3	4	5	5	3
dil-OxLDL binding to LOX-1 on cells (IC50, nM)	5.5	3.3	5.0	4.1	5.9	4.0
Binding of biotinylated LOX-1 antibodies to Human Neutrophils (EC_{50}, μg/mL)	0.15	0.13	0.23	0.08	0.28	0.04

Example 8: LOX-1 Antibody Inhibition of OxLDL Binding to LOX-1/HEK293 Cells

The huLOX-1/HEK293 cells were maintained in DMEM containing 10% FBS and 1% Penicillin-Streptomycin as an adherent monolayer in T flasks containing 20ml culture medium per 75 cm^2 surface area. The cells were incubated in a humidified incubator at 5% CO_2 and 37 °C, and sub-cultivated every 2-3 days. To passage the cells, the culture medium is removed, and the monolayer is washed once with 10-20 ml pre-warmed PBS.

After washing, 1 ml of pre-warmed TrypLE Express is added, and the cells were incubated at 37 °C for 5 min. Pre-warmed fresh culture medium was then added.

The huLOX-1/HEK293 cells were resuspended at $1x10^6$ cells/mL and seeded 50 μL per well into a 96-well V-bottom plate ($5 x10^4$ cells per well). LOX-1 or irrelevant control antibodies in assay medium (DMEM + 10% FBS) were then added to the cells. Typical final antibody concentrations ranged from 0.006 μg/mL to 20 μg/mL. The cells were incubated at 37 °C for 1 hour, then washed twice with warm HBSS. Dil-oxLDL (human dil-labeled "High Oxidized" LDL, Kalen Biomedical, catalog number 770262-9; Dil is 1,1'-dioctadecyl- 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) in 50ul assay medium was then added to a final concentration 30 to 100 μg/mL. The cells were then incubated at 37 °C for 2 hours, and then washed twice with FACS buffer (2%FBS in PBS). Cells were then analyzed for intensity of Di-I fluorescence by flow cytometry, as depicted in Figure 2 and Table 3.

Example 9: OxLDL Induced Reactive Oxygen Species (ROS) Production Assay

LOX-1 antibodies or irrelevant control antibodies were incubated at 2x final concentration either alone or in the presence of a $(Fab)_2$ cross-linker (polyclonal goat anti-human IgG Fc $(Fab)_2$, Abcam catalog number ab98526)) in 0.05 mL assay medium (DMEM + 10% FBS) and incubated at room temperature for 15 min. The $(Fab)_2$ cross-linker to LOX-1 antibody ratio was varied and included 1:1 and 1:2 ratios. In dose response experiments with LOX-1 or control antibody alone (without cross-linker), antibody concentrations ranging from 0.005 μg/mL to 20 μg/mL were used. In experiments comparing antibody alone to antibody with cross-linker, antibody concentrations ranging from 0.03 μg/mL to 20 μg/mL were used.

Cells expressing human LOX-1 (huLOX1/HEK293) were dissociated using TrypLE Express (Invitrogen catalof number 12605-010) and washed once with PBS. The cells were then resuspended at $2 x 10^6$ cells/mL in assay medium (DMEM + 10% FBS) and seeded at 50 μl/well ($1 x 10^5$ cells/well) into a 96-well V-bottom plate (Costar catalog number 3894). 50 μl/well of LOX-1 (or control) antibody solution with or without cross-linking Fab (prepared as described above) was added and the mixture was incubated for 15 min at 37 °C. OxLDL (0.1 mL /well in assay buffer, "High oxLDL" from Kalen, catalog number 770252-7) was added to a final concentration of 25 μg/mL, and the resulting mixture was incubated for 100 min at 37 °C. H2DCFDA was diluted in

assay medium and 0.1 mL/well added to a final concentration of 5-10 μM, and the mixture incubated for 15 min at 37 °C. The cells were then washed once with 200 μl/well of HBSS containing calcium and magnesium, once with 200 μl/well of cold FACS buffer (2% FBS in PBS), and the cells were resuspended in 50-100 μL/well of cold FACS buffer. The fluorescence generated as a result of H2DCFDA oxidation was measured using a flow cytometer (excitation: 488 nm, emission: 500/530 nm). Exemplary results are shown in Figures 3 and 4, and Table 4.

Table 4:

LOX-1 antibodies inhibit oxLDL induced reactive oxygen species (ROS) production in human LOX-1 transfected HEK293 cells (table with IC50 values), with no evidence for LOX-1 agonist activity (antibody alone or antibody + cross-linking Fab_2)

	FF1	FF3	FF4	FF5	FF6	E2E10 (murine parental)
Reactive oxygen species (ROS) generation in huLOX-1/HEK293 cells (IC_{50}, nM)	6.0	7.4	5.3	4.8	7.9	5.7
LOX-1 agonism?	No	No	No	No	No	No
LOX-1 agonism (antibody + anti-human Fab2 at 1:2 Fab2 to antibody molar ratio)	No	No	No	No	No	No
LOX-1 agonism (antibody + anti-human Fab2 at 1:1 Fab2 to antibody molar ratio)	No	No	No	No	No	No

As seen in Figures 4A-4F, LOX-1 antibodies inhibit oxLDL induced reactive oxygen species (ROS) production in human LOX-1 transfected HEK293 cells. In the absence of oxLDL, LOX-1 antibodies (antibodies alone or in the presence of a cross-linking Fab_2) do

not induce ROS production. An isotype control antibody has no effect on oxLDL induced ROS production in human LOX-1 transfected HEK293 cells.

Example 10: LOX-1 Antibodies Bind to Native LOX-1 Primary Human Neutrophils

LOX-1 antibodies were biotinylated using a kit from Thermo Scientific (EZ-Link Micro NHS-PEO4-Biotinylation Kit; Thermo Scientific catalog number 21955). Antibodies in PBS buffer at 0.5-1.0 mg/mL concentration were incubated with a 50-fold molar excess of NHS-biotin reagent at room temperature for 60 min. The biotinylated antibody was then separated from excess biotinylation reagent using a desalting spin column equilibrated in PBS and used according to the manufacturer's instructions (Zeba Desalt Spin Column 7K MWCO, Thermo Scientific catalog number 89882). The concentration of the biotinylated antibody was determined based on measurement of the absorbance at 280nm.

Neutrophils were isolated from blood samples obtained from healthy donors using standard methods. Briefly, human whole blood was collected in a vial containing EDTA. To 10 mL of the blood sample, 10 mL of Sedimentation Buffer (3% dextran, 0.9% sodium chloride) was added, and the resulting solution was gently mixed and allowed to stand at room temperature for 20 minutes. The top layer comprising leukocyte-rich plasma was centrifuged at 1200 rpm (250-500 x g) for 10 minutes at 4 °C. The supernatant was discarded, and the cell pellet immediately resuspended in 10 mL of 0.9% sodium chloride at room temperature. The resulting cell suspension was carefully transferred to a 50 mL conical tube containing 10 mL Ficoll-Paque, layering the cell suspension on top of the Ficoll-Paque, and the tube was then centrifuged at 1400 rpm (400 x g) for 30 minutes at room temperature. The top layer was the discarded. To the resulting cell pellet, 10 mL 0.2% ice-cold sodium chloride was added, and the mixture was incubated for exactly 30 seconds to lyse red blood cells; 10 mL of ice-cold 1.6% sodium chloride was added to restore isotonicity. The cell suspension was then centrifuged at 1200 rpm (250-500 rpm) for 5 minutes. The supernantant was then discarded, and the red blood cell lysis procedure repeated once more. The resulting cell pellet was resuspended in FACS buffer (2 mM EDTA, 1% BSA, and 0.2% sodium azide in PBS) at a cell density of 2 x 10^6 cells/mL.

The cell suspension containing freshly isolated human neutrophils was transferred (50ul/well) to wells of a 96-well V-bottom plate (1 x 10^5 cells/well) (Costar,

catalog number 3894). . Blocking buffer (4% normal rabbit serum diluted in FACS buffer (2 mM EDTA, 1% BSA, and 0.2% sodium azide in PBS) (50 ul/well) was added and the plate was incubated on ice for 30 minutes. Biotinylated LOX-1 antibody (10 ul) in FACS buffer was then added to the wells at final concentrations ranging from 1ng/ml to 5 ug/mL, and the plate was incubated on ice for 30 minutes. The plate was then centrifuged at 1200 rpm (250-300 x g) for 3 minutes and supernatant was discarded. The cells were then washed twice with 0.2 mL FACS buffer, and then 0.1 mL of PE-straptavidin (BD Pharmingen catalog number 554061) diluted at 1:250 in FACS buffer was added, and the plate incubated on ice for 30 minutes. The plate was then centrifuged again, supernatant discarded, and the cells washed twice with 0.2 mL FACS buffer. Cells were then resuspended in 0.1 mL of fixing buffer (FACS buffer with 2% paraformaldehyde) and analyzed using a FACS instrument. To determine an EC50 value for neutrophil binding by LOX-1 antibodies, the LOX-1 staining intensity determined by FACS was plotted vs. the concentration of the antibody as shown in Figure 5 and Table 3.

Example 11: Epitope Mapping by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry

Hydrogen-deuterium exchange (HDx) in combination with mass spectrometry (MS) (Woods, 2001) was used to map the binding site of antibody E2E10 on LOX-1. In HDx, exchangeable amide hydrogens of proteins are replaced by deuterium. This process is sensitive to protein structure/dynamics and solvent accessibility and, therefore, able to report on ligand binding. The non-invasive nature of HDxMS, high sensitivity, ability to work with large proteins, and the high resolution with which binding sites can be mapped sets it apart from other methods. The goal of these experiments was the identification of the epitope of E2E10 on LOX1.

Automated HDx/MS experiments were performed using methods similar to those described in the literature (Chalmers, 2006). 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 and was housed in a refrigerated enclosure maintained at 2 °C. A 6-port injection valve and a wash station were mounted on the liquid-handler rail and facilitated sample injection into the chromatographic system and syringe washing. For on-line digestion, an enzyme column (Poroszyme immobilized pepsin, 20 x 2.1 x 30mm, ABI, Foster City, CA) was

placed in line between the injection valve and a trapping cartridge. The chromatographic system, consisting of two additional valves (15kPSI Valco, Houston, TX), a 4µL EXP Halo C18 reversed-phase trap cartridge (Optimize Technologies Inc., Oregon City, OR), and an analytical column (300µm ID, Halo 2.7µm C18, Michrom Bioresources Inc.), was housed in a separate cooled enclosure that was mounted in front of the source of the LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA). The temperature of the enclosure housing the chromatographic system was maintained at 0 °C by peltier coolers.

For non-deuterated and deuterated controls, 10 µL of human soluble LOX-1 solution (0.73mg/mL) was diluted with 15 µL of 50 mM triethanolamine buffer (pH 7.8). Complexes were prepared by mixing 10 µL of LOX-1 solution (0.73mg/mL) with an equimolar amount of E2E10 and the appropriate amount of 50mM triethanolamine buffer (pH 7.8) to bring the total volume to 25 µL. After forming complexes, the solutions were allowed to incubate for 30 min. To initiate the exchange reaction, 75 µL of D_2O buffer (D_2O in 150 mM NaCl, Cambridge Isotopes Laboratories) was added and allowed to exchange for 10 min. The pH of the mixture was then lowered with the addition of 0.25 mL of reduction buffer (8 M Urea, 2 M Thiourea, 0.25 M TCEP, pH 2.5) to reduce disulfide bonds and slow down the exchange rate, effectively freezing the exchange state of the sample. After 10 min. of reduction, the mixture was diluted with 0.5 mL of quench buffer (50mM Glycine, pH 2.5). Next, 0.5 mL of the sample was injected through an inline digestion column onto a trap, and analyzed by LC-MS as described below.

The chromatography system uses two separate HPLC pumps to perform in-line digestion, trap the digested peptides onto a C18 trap column, and elute trapped peptides through an analytical column into the mass spectrometer. The “loading” pump (Surveyor MS pump, Thermo Scientific, San Jose, CA), operated at a flow rate of 125 µL/min (0.05% TFA), transferred samples from the PAL injection valve sample loop (500 µL), through the pepsin column, and into the reversed-phase trap cartridge. After a 6 min. loading step, a “load” valve was switched to allow buffer (0.25% formic acid) from the “gradient” pump (Nano Acquity, Waters Corp., Milford, MA) to flow through the trap at a flow rate of 20 µL/min for a 3 min. desalting period. After the desalting step, a “desalt” valve was switched to facilitate elution of peptides from the trap and onto the analytical column and into the ion source of the mass spectrometer. The gradient pump delivered a gradient of 0 to 40% B over 20 min. followed by 40% to 75% B over 5 min.. The total time for the gradient was 30 min. The gradient pump buffer compositions were A: 99.75:0.25 %v/v (H_2O:formic acid) and B: 99.75:0.25 %v/v (acetonitrile:formic acid).

Proteolytic peptides were sequenced by tandem mass spectrometry (MS/MS). The same method was used for the acquisition of non-deuterated LOX-1, deuterated LOX-1, and all of the deuterated complex samples even though only MS2 data from the non-deuterated LOX1 run were used for peptide identification. For these acquisitions, MS/MS were acquired in the LTQ and MS scans were acquired in the Orbitrap. Acquisitions in the Orbitrap were acquired at a resolution of 60,000 over the m/z range of 400-2000. The instrument parameters used for all experiments included a spray voltage of 3.5kV, a maximum injection time of 1000 ms, LTQ AGC target for MS of 50,000 ions and an FTMS AGC target for MS of 1,000,000 ions. To initiate data processing, Orbitrap .RAW files were converted into .mzXML files (Pedrioli 2004) using an in-house program (RawXtract). Subsequently, .mzXML files were converted into .mzBIN files and tandem MS acquisitions were searched using SEQUEST (ThermoElectron). SEQUEST results were filtered using DTASelect (Tabb 2002). Using the peptide sequence identifications, an in-house written program (Deutoronomy) was used to automatically extract chromatograms for each identified sequence ion and generate average spectra over a specified *m/z* range and retention time window. Average spectra were then smoothed and centroided to determine the average deuterium incorporation. After the initial automated processing, the quality and centroiding of each average spectrum was manually validated or corrected using an interactive data viewer built into Deutoronomy.

The HDxMS mapping experiment identified three regions of LOX1 that were significantly protected. Major protection was observed for the peptide F_{228}RVRGAVSQTYPSGTCAYI_{246} (SEQ ID NO.:3). Minor protection of the peptides N_{100}ELKEMIETL$_{109}$ and S_{207}RRNPSYPWLWE$_{218}$ was also observed (SEQ ID NO.: 4 and 5, respectively). The protected regions were mapped onto a the crystal structure of human soluble LOX-1 C-terminal lectin-like domain (CTLD) obtained from the protein data bank (1YPQ). One of the protected regions, N_{100}ELKEMIETL$_{109}$ (SEQ ID NO.: 4), is not present in the LOX-1 CTLD crystal structure. The peptide F_{228}RVRGAVSQTYPSGTCAYI_{246} (SEQ ID NO.: 3) maps to the face of the LOX-1 molecule implicated in ligand binding by published site directed mutagenesis studies (Ohki et al. (2005) Structure, 13: 905-917). The results therefore indicate that E2E10 likely acts as a competitive inhibitor of LOX-1 ligand binding to LOX-1. Since the humaneering process used to convert E2E10 to the humanized variants FF1, FF3, FF4, FF5, and FF6 is very unlikely to change the epitope specificity of the antibody (see Example 6), these results also identify the primary binding site of FF1, FF3, FF4, FF5, and FF6 on LOX-1.

Change in deuterium incorporation of LOX-1 derived peptides due to E2E10 binding to LOX-1 is shown in Table 5.

Table 5

LOX-1 Epitope	SEQ ID NO:	Change in deuterium incorporation
EFRHGLNDIF	124	0
EFRHGLNDIFE	125	0
EAQKIEWHESQVSDL	126	0
AQKIEWHESQVSDL	127	0
LTQEQANLTHQKKKLEGQISARQQAEEASQESENELKE	128	0
LTQEQANLTHQKKKLEGQISARQQAEEASQESENELKEMIETL	129	-2
ASQESENELKEMIETL	130	-1
NELKEMIETL	131	-2
FSSGSFNWEKSQEKC	132	0
FSSGSFNWEKSQEKCLSL	133	0
IQQAISY	134	0
SRRNPSYPWLWEDGSPLMPHL	135	-1
WEDGSPLMPHL	136	0

FRVRGAVSQTYPSGTCAYIQRGAVYAENCILAAFSICQKKANLRAQ	137	-9
YIQRGAVYAEN	138	0
IQRGAVYAEN	139	0
AAFSICQKKANL	140	0
AAFSICQKKANLRAQ	141	0
FSICQKKANL	142	0
FSICQKKANLRAQ	143	0

Example 12: Preparation of Purified Recombinant Cynomolgus Monkey Soluble LOX-1 For Use in LOX-1 Antibody Binding Assays

To determine the nucleotide and amino acid sequences of cynomolgus monkey LOX-1, total RNAs were extracted from organs obtained from 3 individual monkeys: 3 organs from one individual from Zyagen/GW, and 12 organs from 2 induviduals from Covance, Inc. The total RNAs were then used for PCR amplification, using primers from the untranslated region which were designed according to public databases (Uniprot, NCBI). Standard sequencing methods were used to determine the nucleic acid sequences of the amplified LOX-1 mRNAs. Within the extracellular domain of cynomolgus monkey LOX-1 (corresponding to amino acids 61-273), the cynomolgus LOX-1 amino acid sequences derived from the 3 individual monkeys were identical.

A nucleic acid sequence encoding the extracellular domain (amino acid residues 61-273) of cynomolgus monkey LOX-1 polypeptide with N-terminal signal peptide from human CD33, purification tag (EFHR), and BirA biotinylation sequence (GLNDIFEAQKIEWHE) (SEQ ID NO 144) was subcloned into the mammalian cell expression vector pRS5a. Expression and purification of cynomolgus monkey soluble LOX-1 was carried out using the same methods described for human soluble LOX-1 in

Example 1. The amino acid sequence of mature APP-Avi-soluble cynomolgus monkey LOX-1(61-273) is shown in Table 6. For some experiments, cynomolgus monkey soluble LOX-1 protein was biotinylated using the same method described for human soluble LOX-1 in Example 5.

Table 6

SEQ ID 6: Amino Acid Sequence of mature APP-Avi-soluble cynomolgus monkey LOX-1(61-273) (APP and Avi tags underlined)
EFRHGLNDIFEAQKIEWHESQVSNLLKQQQTNLTHQKNKLEGQISARQQAEEASQESQNELKEMI ETLAWKLNEKSKEQMELHHQNLNLQETLKRVANCSAPCPQDWIWHEENCYLFSTGSFNWEKSQEK CLSLDAKLLKINSTADLDFIQQAISYSSFPFWMGLSRRNPSYPWLWEDGSPLMPHLFRIR GAVSQTYPSGTCAYIQRGAVYAENCILAAFSICQKKANLRAQ

Example 12

Antibody Dissociation Constant Determination by Biacore Binding Assay

For murine LOX-1 antibody E2E10 binding to human and cynomolgus monkey LOX-1, a Biacore T200 was primed with fresh, filtered running buffer (1x HBS-EP+ (GE catalog number BR-1006-60)). A CM5 chip (GE catalog number BR-1005-30) was prepared using a mouse antibody capture kit (GE catalog number BR-1008-38) and an amine coupling kit (GE catalog number BR-1000-50). Briefly, a new chip was activated with EDC/NHS at 10ul/min for 420 sec. Anti-mouse IgG antibody was immobilized at 30ug/ml in 10mM acetate pH 5.0 at 10ul/min for 420 sec. The chip surface was deactivated with 1M ethanolamine solution (10ul/min for 420 sec) and then conditioned three times with 10mM Glycine-HCl, pH 1.5 (GE catalog number BR-1003-54) at 60ul/min for 30 sec.

A method run was programmed to measure kinetics of human or cynomolgus monkey soluble LOX-1 binding to anti-LOX-1 antibody. 5 startup cycles were run as follows: 1) running buffer for 30 sec at 60ul/min, 2) Running buffer for 350 sec with 350 sec dissociation at 60ul/min, extra wash with regeneration buffer (Glycine-HCl pH 1.5, 0.05% P20 (GE catalog number BR-1000-54)), 3) Regeneration buffer for 60s at 60ul/min, 4) Regeneration buffer for 35s at 60ul/min, extra wash with running buffer and including a carry-over control.

For sample cycles, 1) Ms-anti-Hu LOX-1 mAb was captured on flow cell 2, 3, or 4 for a pre-determined amount of time that allowed for capture of approximately 20RUs at 10ul/min. Flow cell 1 was used as a reference, 2) running buffer for 30s at 60ul/min, 3) human soluble LOX-1 or cynomolgus monkey soluble LOX-1 diluted in running buffer at various concentrations (with at least two duplicate samples and multiple buffer blanks for 350 sec at 60ul/min, with either 750 sec or 3000 sec dissociation time), 4) regeneration buffer for 60 sec at 60ul/min, 5) running buffer for 35s at 60ul/min, extra wash with running buffer and including a carry-over control. Data were analyzed using buffer blanks, reference blank, and a 1:1 binding model for curve fitting in order to determine association and dissociation rate constants (ka and kd) and equilibrium binding constants (KD) (see results for E2E10 in Tables 7-8).

Surface plasmon resonance measurements quantifying the interaction of humanized LOX-1 antibodies with human or cynomolgus monkey LOX-1 were done with the optical biosensor BIAcore T200 on a CM5 chip. Goat-anti-hIgG (gamma) (Invitrogen H10500) was coated at 3,000 RU on the CM5 chip in acetate buffer, pH 4.0. The running buffer used was PBS, pH 7.4 (filtered, degassed). Test antibodies were loaded into individual flow cells at a concentration of 1 ug/mL at a flow rate of 10 uL/min. The target number of IgG capture was between 20-30 RU, in HBS-EP buffer (0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% P20). Human or cynomolgus monkey soluble LOX-1 was diluted to a concentration of 33 nM in HBS-EP buffer, then diluted serially (1:3) down to a concentration of 0.137 nM. This represents six different concentrations of human or cynomolgus monkey LOX-1. The antigen was introduced into individual flow cells at a flow rate of 30 uL/min. Parameters for association time were set at 700 seconds and dissociation time was set at 5,400 seconds. Data were analyzed using buffer blanks, reference blank, and a 1:1 binding model for curve fitting in order to determine association and dissociation rate constants (ka and kd) and equilibrium binding constants (KD) (see results for FF1, FF3, FF4, FF5, and FF6 in Tables 7-8).

Table 7

Dissociation Constants (K_D) of LOX-1 Antibodies Binding to Human Soluble LOX-1 Determined By Biacore Kinetic Binding Assays

	FF1	FF3	FF4	FF5	FF6	E2E10 (murine parental)
k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	$1.0x10^{6}$	$1.0x10^{6}$	$2.2x10^{6}$	$1.1x10^{6}$	$6.8x10^{5}$	$1.7x10^{6}$

k_d (s^{-1})	$1.9x10^{-5}$	$2.0x10^{-5}$	$5.2x10^{-6}$	$3.6x10^{-5}$	$2.3x10^{-5}$	$3.2x10^{-5}$
K_D, pM	19	21	2	34	34	18

Table 8

Dissociation Constants (K_D) of LOX-1 Antibodies Binding to Cynomolgus Monkey Soluble LOX-1 Determined By Biacore Kinetic Binding Assays

	FF1	FF3	FF4	FF5	FF6	E2E10 (murine parental)
k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	$1.1x10^{6}$	$7.7x10^{5}$	$2.1x10^{6}$	$1.4x10^{6}$	$9.5x10^{5}$	$1.7x10^{6}$
k_d (s^{-1})	$1.3x10^{-5}$	$1.7x10^{-5}$	$2.6x10^{-6}$	$4.8x10^{-5}$	$5.0x10^{-5}$	$2.5x10^{-5}$
K_D, pM	12	23	1	35	53	15

Example 13: Antibody Dissociation Constant Determination By Solution Equilibrium Titration (SET) Assay

The following SET protocol was used to determine KD value for biotinylated E2E10 binding to human soluble LOX-1. A 96-well MSD plate (Standard Bind plate, MSD catalog number L15XA-3) was coated with 50 uL 0.25 ug/mL human soluble LOX-1 in PBS by overnight incubation at 4 °C. The solution-phase samples were prepared by titration of human soluble LOX-1 in SET diluent (PBS, 0.5% BSA, 0.1% Tween-20, 0.1% Triton X-100) in a polypropylene V-bottom 96-well plate. This dilution series was combined 1:1 (100 μL total) with biotinylated E2E10 diluted in SET diluent, and the samples were incubated overnight at room temperature with shaking.

The coated MSD plate was washed three times with wash buffer (PBS, 0.05% Tween-20) using a plate washer and then inverted and blotted on a Kimwipe to remove residual liquid. The plate was then blocked with 200 uL/well SET blocking buffer (PBS, 2% BSA, 0.1% Tween-20, 0.1% Triton X-100) and incubated for 1 hr with gentle shaking. The plate was washed once. 25 μL/well of the solution-phase equilibrium binding sample was added to the plate, in duplicate, and incubated for 30 min with shaking. The plate was washed three times. 25 μL/well Streptavidin SULFO-TAG (MSD catalog number R32AD-1) diluted 1:500 in SET diluent was added to the plate and incubated for 1hr with gentle shaking. The plate was washed three times. 100 μL Read Buffer T (MSD catalog number R92TC-1) was added to the plate and read on an MSD SECTOR

Imager 6000. The KD values were determined by fitting the data to the following equation:

Y= (Bmax/(CAb/2))((CAb/2)-((((((CAg+CAb)+KD)/2)-((((((CAg+CAb)+KD)^2)/4)-(CAg*CAb))^0.5))^2)/(2*CAb))),*

where Bmax is the signal when no LOX-1 protein is present in solution, CAb is the constant concentration of LOX-1 antibody in solution, CAg is the concentration of soluble LOX-1 in solution, and KD is the equilibrium binding constant .

For humanized LOX-1 antibodies FF1, FF3, FF4, FF5, and FF6, the following solution equilibrium titration (SET) assay protocol was used to determine K_D values. The assays were performed in a 96-well polypropylene plate (Thermo Scientific, Catalog no. AB-1127) as follows. A constant concentration of LOX-1 antibody (1 pM) was mixed with different concentrations of non-biotinylated human or cynomolgus monkey LOX-1 protein (3-fold serial dilution ranging from 1 nM to 0.017 pM) in SET buffer (PBS, pH 7.4 without $CaCl_2$ or $MgCl_2$, Gibco, catalog no. P7949; 0.5% w/v bovine serum albumin, fatty acid free, Calbiochem, catalog no. 26575; and 0.02% v/v Tween-20, Sigma, catalog no. P7949). The final reaction volume was 80 μL. The plate was sealed using an adhesive film (VWR, catalog no. 60941-062) and incubated at 22 °C for 14 hours with constant shaking (300 rpm).

During the same period, a 384-well streptavidin-coated MSD plate (Meso Scale Discovery, catalog no. L21SA) was blocked by incubating the plate with 50 μL blocking buffer (PBS, pH 7.4, 5% w/v bovine serum albumuin) per well overnight at 4 °C. The blocked MSD plate was then washed 3 times with wash buffer (PBS, pH 7.4 and 0.05% v/v Tween-20) using a plate washer (BioTek). Following washing, biotinylated human or cynomolgus monkey soluble LOX-1 protein (25 pM, 15 μL per well) was immobilized on the surface by incubation at 22 °C for one hour with constant shaking (600 rpm). The plate was then washed 3 times as described earlier. In some experiments, non-biotinylated soluble human LOX-1 protein was used (R&D systems, catalog no. 1798-LX-050) was used; in this case the LOX-1 protein was immobilized by overnight incubation at 1 nM concentration in a standard MSD plate (MSD, catalog no. L21XA). The equilibrium binding reactions (15 μL per well) were then applied to the MSD plate with immobilized LOX-1 and incubated for 30 min. The unbound material was removed by washing the plate, and the captured antibody was detected by adding 15 μL per well of a

1:500 dilution of Sulfo-tagged goat anti-human IgG (Meso Scale Discovery, catalog no. R3AJ-1). The plate was then incubated for one hour with constant shaking (600 rpm). The plate was washed 3 times, and then 15 μL/well of 1X MSD read buffer T(Meso Scale Discovery, catalog no. R92TC-2) was added and the plate was developed using a Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery). The data were transferred to Excel for analysis and plotted using GraphPad Prism v5. The K_D values were determined by fitting the data to the following equation:

Y= (Bmax/(CAb/2))((CAb/2)-((((((CAg+CAb)+KD)/2)-((((((CAg+CAb)+KD)^2)/4)-(CAg*CAb))^0.5))^2)/(2*CAb))),*

where Bmax is the signal when no LOX-1 protein is present in solution, CAb is the constant concentration of LOX-1 antibody in solution, CAg is the concentration of soluble LOX-1 in solution, and KD is the equilibrium binding constant. Results for FF1, FF3, FF4, FF5, FF6 and E2E10 are shown in Table 9 and Figure 6).

Table 9

LOX-1 Antibody Dissociation Constants (K_D) Determination By Solution Equilibrium Titration (SET) Assays

Soluble LOX-1	FF1	FF3	FF4	FF5	FF6	E2E10 (mouse parental)
Human Soluble APP-Avi-LOX-1 (K_D, pM by SET)	1.8	1.6	0.5	0.7	2.3	2
Human Soluble His_9-LOX-1 from R&D Systems (K_D, pM by SET)	3.1	2.3	0.7	0.8	2.0	ND
Cynomolgus Monkey Soluble APP-Avi-LOX-1 (K_D, pM by SET)	1.8	3.4	0.7	0.6	1.6	ND

Incorporation By Reference

All references cited herein, including patents, patent applications, papers, text books, and the like, and the references cited therein, to the extent that they are not already, are hereby incorporated herein by reference in their entirety.

Equivalents

The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. The foregoing description and examples detail certain preferred embodiments of the invention and describe the best mode contemplated by the inventors. It will be appreciated, however, that no matter how detailed the foregoing may appear in text, the invention may be practiced in many ways and the invention should be construed in accordance with the appended claims and any equivalents thereof.

Claims:

1. An isolated anti-LOX-1 antibody or fragment thereof.

2. An isolated anti-LOX-1 antibody or fragment thereof that binds to the ligand binding domain of LOX-1.

3. An isolated antibody or fragment thereof that binds to an epitope of LOX-1, wherein the epitope comprises amino acid residues 100-109, 207-218, or 228-246 of LOX-1.

4. An isolated antibody or fragment according to any previous claim, wherein said antibody or fragment blocks OxLDL binding to LOX-1 protein.

5. An isolated antibody or fragment according to any previous claim, wherein said antibody or fragment inhibits oxLDL induced reactive oxygen species (ROS) production.

6. An isolated antibody or fragment thereof that binds to a human LOX-1 protein with a KD of less than or equal to 34 pM, as measured by Biacore, or less than or equal to 4 pM, as measured by solution equilibrium titration assay (SET).

7. An isolated antibody or fragment according to any previous claim, wherein said antibody or fragment comprises at least one complementarity determining region having at least 95% identity to at least one of the CDRs recited in Table 1.

8. An isolated antibody or fragment according to any previous claim, wherein said antibody or fragment comprises a CDR1, CDR2, and CDR3 from Table 1.

9. An isolated antibody or fragment according to any previous claim, wherein said antibody or fragment comprises a CDR1, CDR2, and CDR3 from Table 1, wherein the variant has at least one to four amino acid changes in one of CDR1, CDR2, or CDR3.

10. An isolated antibody or fragment thereof that binds human LOX-1, wherein the antibody or fragment comprises a heavy chain CDR3 selected from the group consisting of SEQ ID NO: 10, 30, 50, 70, and 90.

11. An isolated antibody or fragment thereof that binds human LOX-1, wherein the antibody or fragment comprises a VH selected from the group consisting of SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, or 94; and a VL selected from the group consisting of SEQ ID NO: 24, 44, 64, 84, or 104 or an amino acid sequence with 97-99% identity thereof.

12. An isolated antibody or fragment thereof comprising a variable heavy chain sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, or 94.

13. An isolated antibody or fragment thereof comprising a variable light chain sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 24, 44, 64, 84, or 104.

14. An isolated antibody or fragment thereof comprising a variable heavy chain selected from the group consisting of SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, or 94; and variable light chain sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 24, 44, 64, 84, or 104.

15. An isolated antibody or fragment thereof, comprising a heavy chain variable region CDR1 selected from the group consisting of SEQ ID NO: 8, 28, 48, 68, and 88; CDR2 selected from the group consisting of SEQ ID NO: 9, 29, 49, 69, and 89; CDR3 selected from the group consisting of 10, 30, 50, 70, and 90; a light chain variable region CDR1 selected from the group consisting of SEQ ID NO: 18, 38, 58, 78, and 98; CDR2 selected from the group consisting of SEQ ID NO: 19, 39, 59, 79, and 99; and CDR3 selected from the group consisting of SEQ ID NO: 20, 40, 60, 80, and 100.

16. An isolated antibody or fragment thereof, comprising a heavy chain variable region CDR1 selected from the group consisting of SEQ ID NO: 11, 31, 51, 71, and 91; CDR2 selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12, 32, 52, 72, and 92; CDR3 selected from the group consisting of 13, 33, 53, 73, and 93; a light chain variable region CDR1 selected from the group consisting of SEQ ID NO: 21, 41, 61, 81, and 101; CDR2 selected from the group consisting of SEQ ID NO: 22, 42, 62, 82, and 102; and CDR3 selected from the group consisting of SEQ ID NO: 23, 43, 63, 83, and 103.

17. An isolated antibody or fragment thereof, comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 8; CDR2 of SEQ ID NO: 9; CDR3 of SEQ ID NO: 10; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 11; CDR2 of SEQ ID NO: 12; and CDR3 of SEQ ID NO: 13.

18. An isolated antibody or fragment thereof, comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 28; CDR2 of SEQ ID NO: 29; CDR3 of SEQ ID NO: 30; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 31; CDR2 of SEQ ID NO: 32; and CDR3 of SEQ ID NO: 33.

19. An isolated antibody or fragment thereof, comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 48; CDR2 of SEQ ID NO: 49; CDR3 of SEQ ID NO: 50; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 51; CDR2 of SEQ ID NO: 52; and CDR3 of SEQ ID NO: 53.

20. An isolated antibody or fragment thereof, comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 68; CDR2 of SEQ ID NO: 69; CDR3 of SEQ ID NO: 70; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 71; CDR2 of SEQ ID NO: 72; and CDR3 of SEQ ID NO: 73.

21. An isolated antibody or fragment thereof, comprising a heavy chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 88; CDR2 of SEQ ID NO: 89; CDR3 of SEQ ID NO: 90; a light chain variable region CDR1 of SEQ ID NO: 91; CDR2 of SEQ ID NO: 92; and CDR3 of SEQ ID NO: 93.

22. A pharmaceutical composition comprising an antibody or fragment thereof of one of the above claims and a pharmaceutically acceptable carrier.

23. A method of treating a LOX-1-disorder comprising administering to a subject afflicted with a LOX-1-disorder an effective amount of a pharmaceutical composition comprising an antibody or fragment according to any previous claim.

24. The method of claim 23, wherein the subject is afflicated with one or more of intermittent claudication and Rutherford Class II/III Claudication.

25. The method of claim 23, wherein the subject is afflicated with angina.

26. An isolated antibody or fragment thereof that binds to the same epitope as an isolated antibody or fragment according to any previous claim.

27. An isolated antibody or fragment thereof that binds to a human LOX-1 protein and cross-competes with an isolated antibody or fragment according to any previous claim.

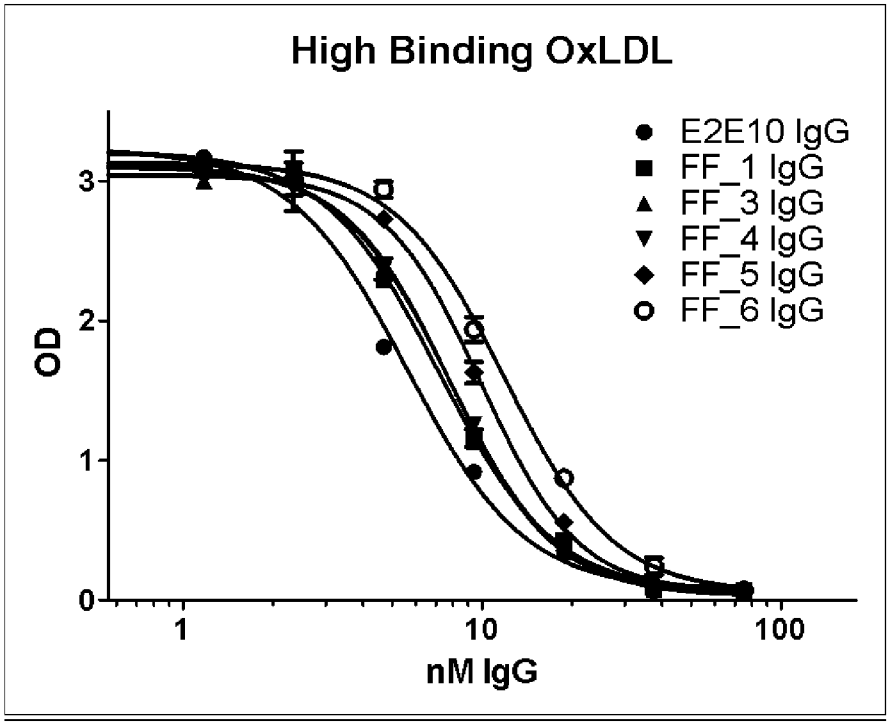

High Binding OxLDL
E2E10 IgG
FF_1 IgG
FF_3 IgG
FF_4 IgG
FF_5 IgG
FF_6 IgG
OD
0
1
2
3
1
10
100
nM IgG

FIG 1A

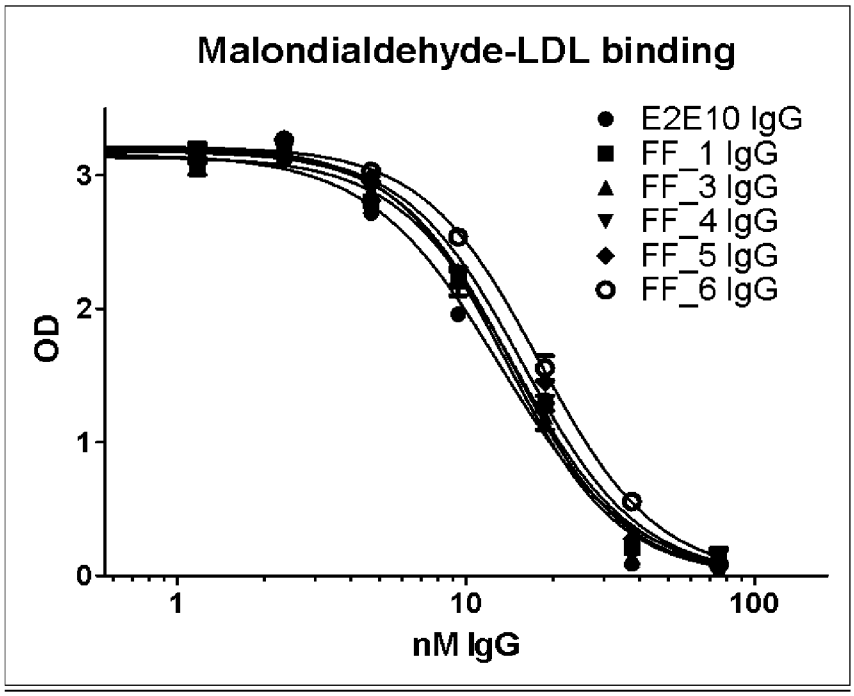

Malondialdehyde-LDL binding
E2E10 IgG
FF_1 IgG
FF_3 IgG
FF_4 IgG
FF_5 IgG
FF_6 IgG
OD
0
1
2
3
1
10
100
nM IgG

FIG 1B

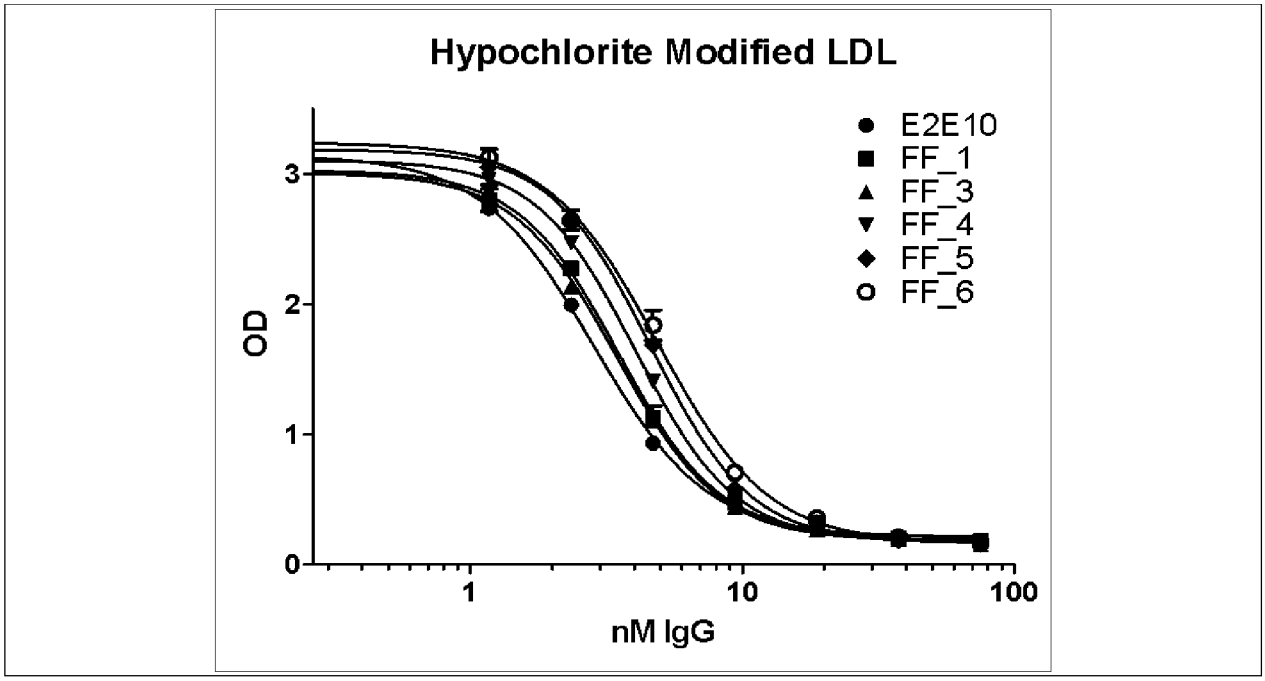

Hypochlorite Modified LDL
E2E10
FF_1
FF_3
FF_4
FF_5
FF_6
OD
0
1
2
3
1
10
100
nM IgG

FIG 1C

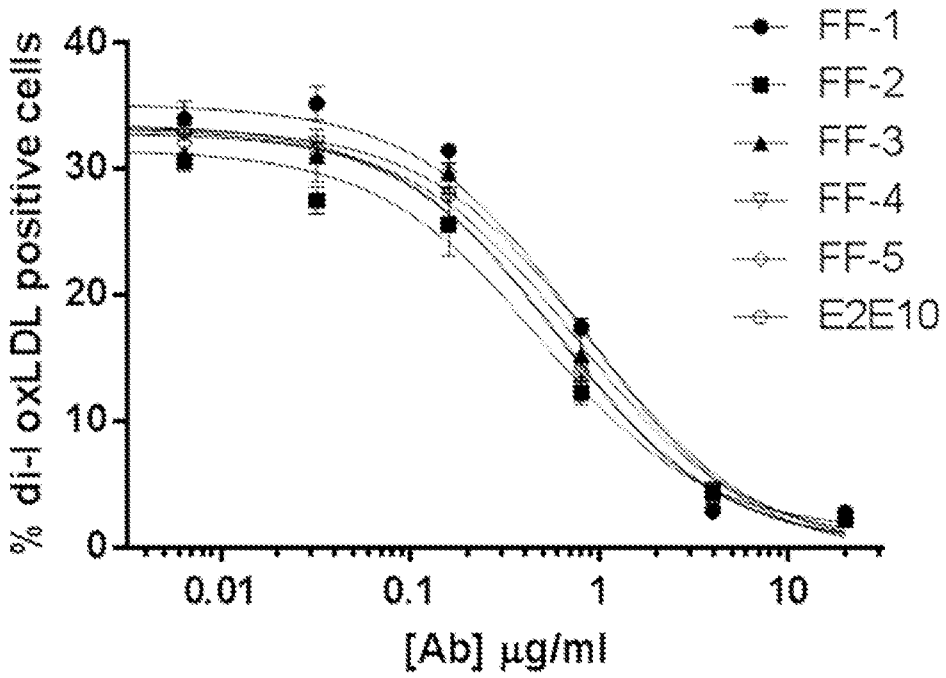

% di-I oxLDL positive cells
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
[Ab] µg/ml
FF-1
FF-2
FF-3
FF-4
FF-5
E2E10

FIG 2

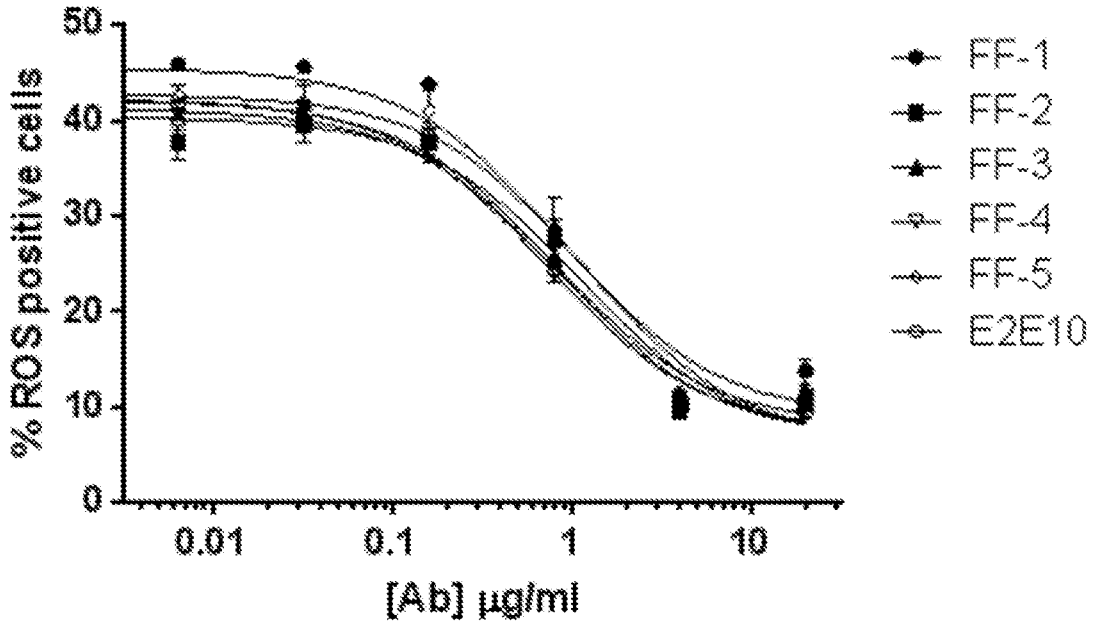

% ROS positive cells
50
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
[Ab] µg/ml
FF-1
FF-2
FF-3
FF-4
FF-5
E2E10

FIG 3

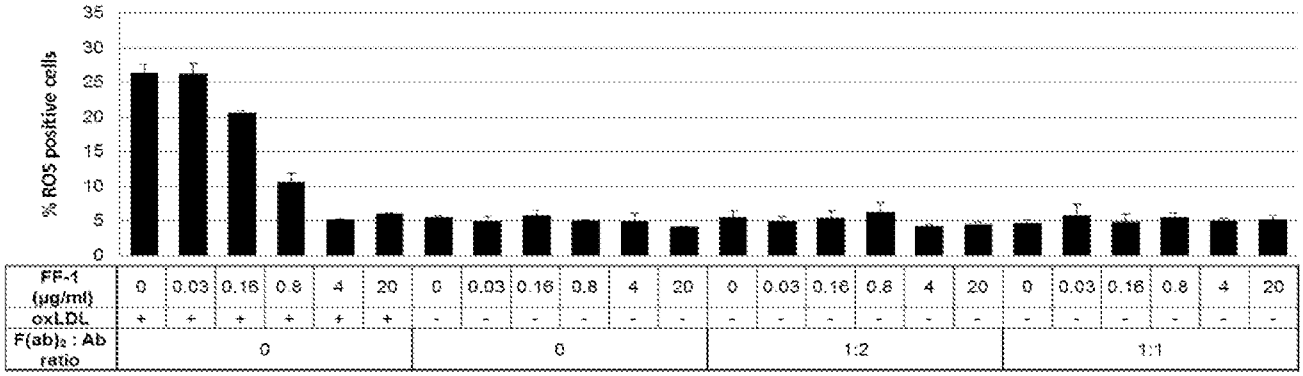

% ROS positive cells
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-1 (µg/ml)
0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL
+ + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
F(ab)2 : Ab ratio
0
0
1:2
1:1

FIG 4A

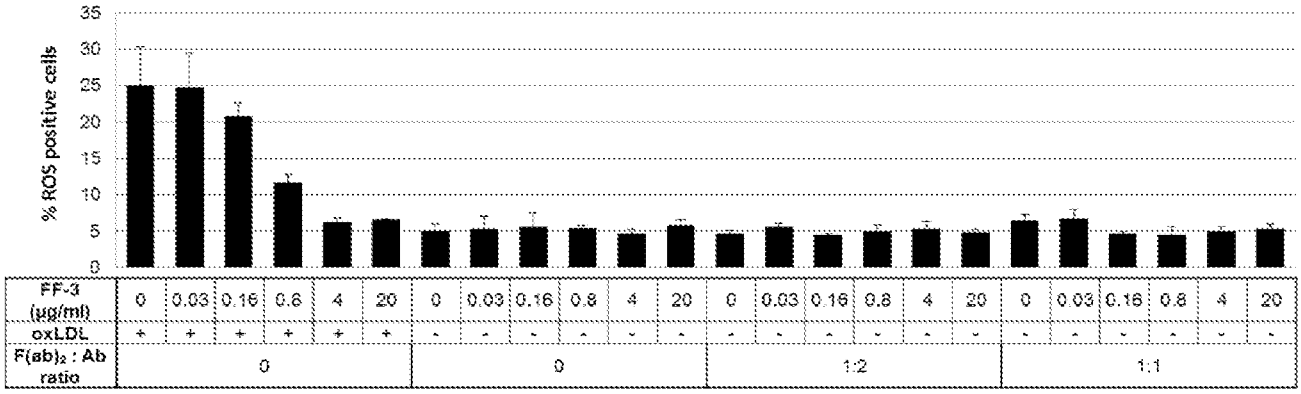

% ROS positive cells
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-3 (µg/ml)
0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL
+ + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
F(ab)2 : Ab ratio
0
0
1:2
1:1

FIG 4B

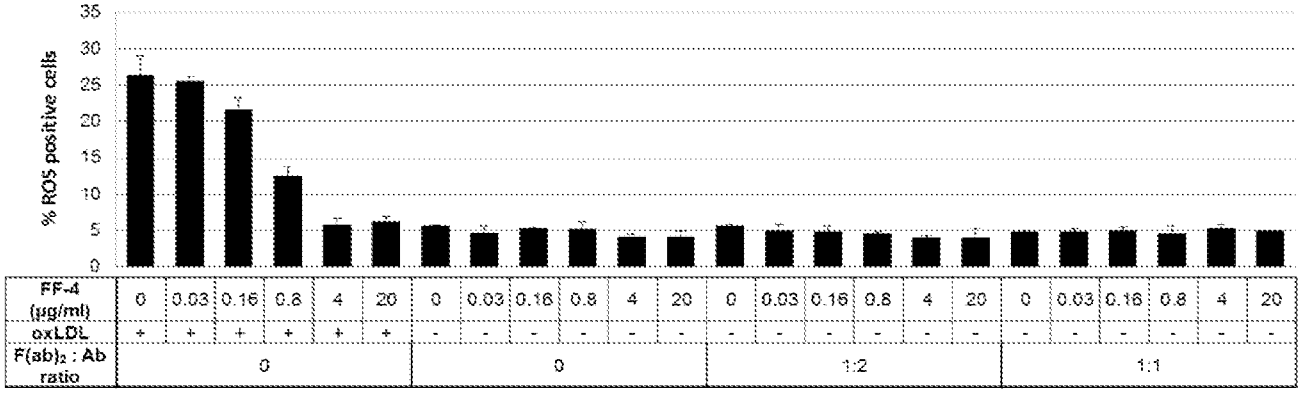

% ROS positive cells
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-4 (µg/ml)
0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL
+ + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
F(ab)2 : Ab ratio
0
0
1:2
1:1

FIG 4C

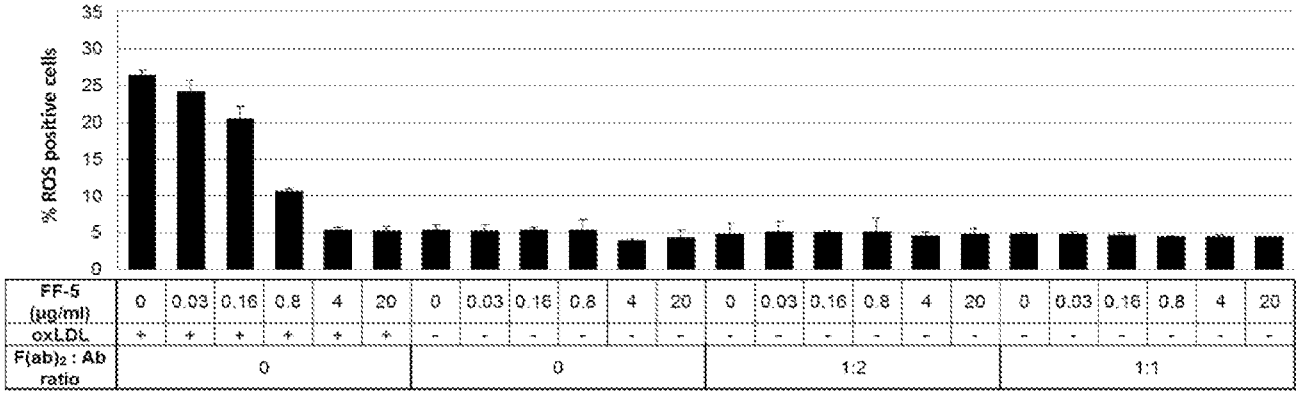

% ROS positive cells
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-5 (µg/ml)
0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL
+ + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
F(ab)2 : Ab ratio
0
0
1:2
1:1

FIG 4D

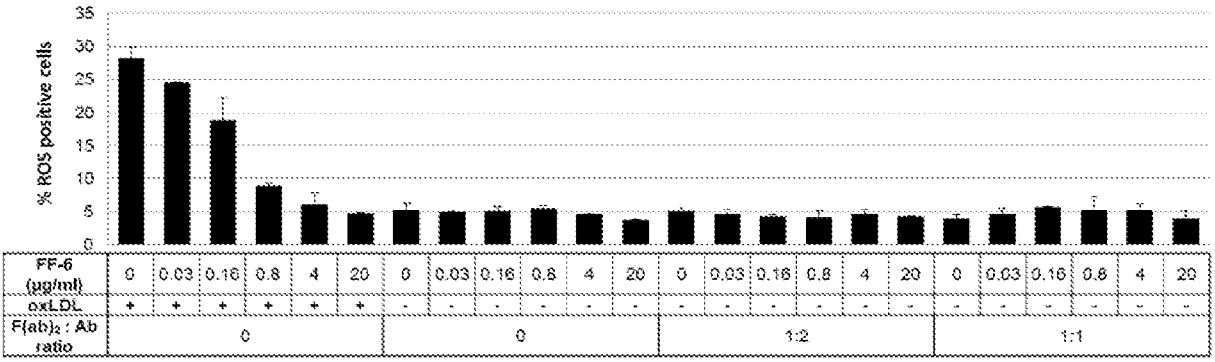

% ROS positive cells
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-6 (μg/ml) 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL + + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
F(ab)2 : Ab ratio 0 0 1:2 1:1

FIG 4E

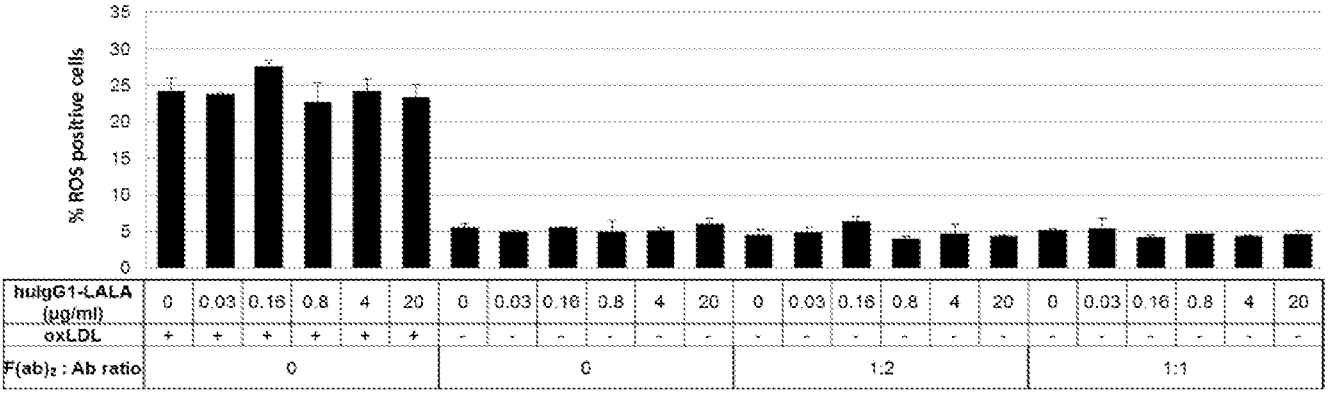

% ROS positive cells
35
30
25
20
15
10
5
0
huIgG1-LALA (μg/ml) 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL + + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
F(ab)2 : Ab ratio 0 0 1:2 1:1

FIG 4F

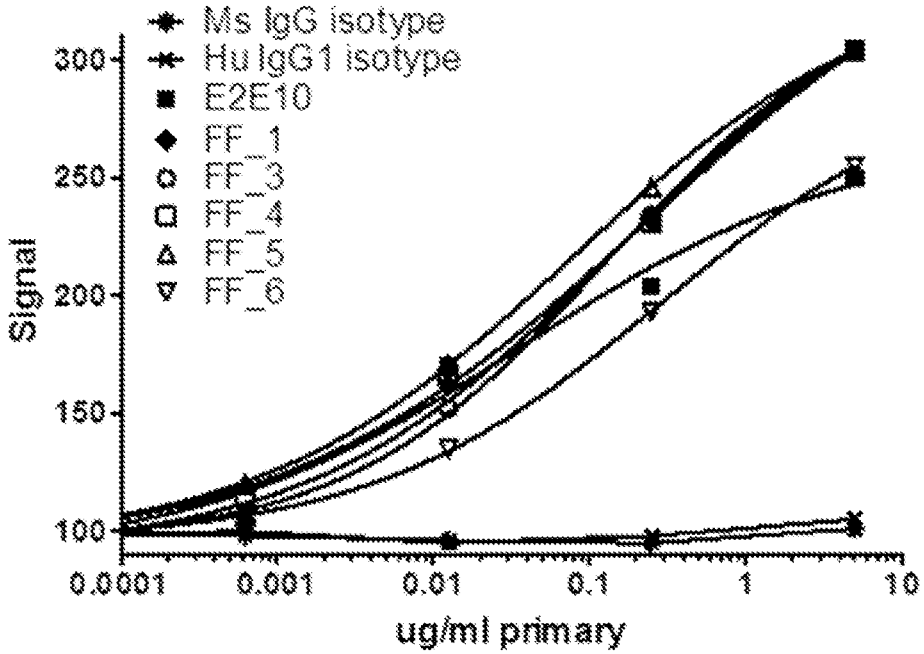

Ms IgG isotype
Hu IgG1 isotype
E2E10
FF_1
FF_3
FF_4
FF_5
FF_6
Signal
300
250
200
150
100
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
ug/ml primary

FIG 5

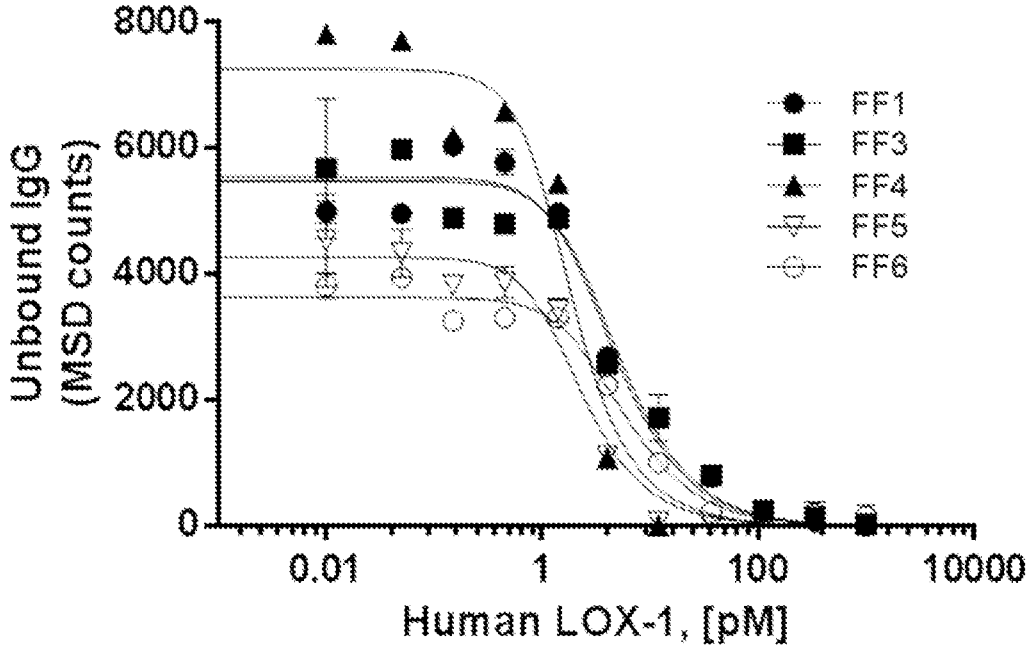

8000
6000
4000
2000
0
Unbound IgG (MSD counts)
0.01
1
100
10000
Human LOX-1, [pM]
FF1
FF3
FF4
FF5
FF6

FIG 6A

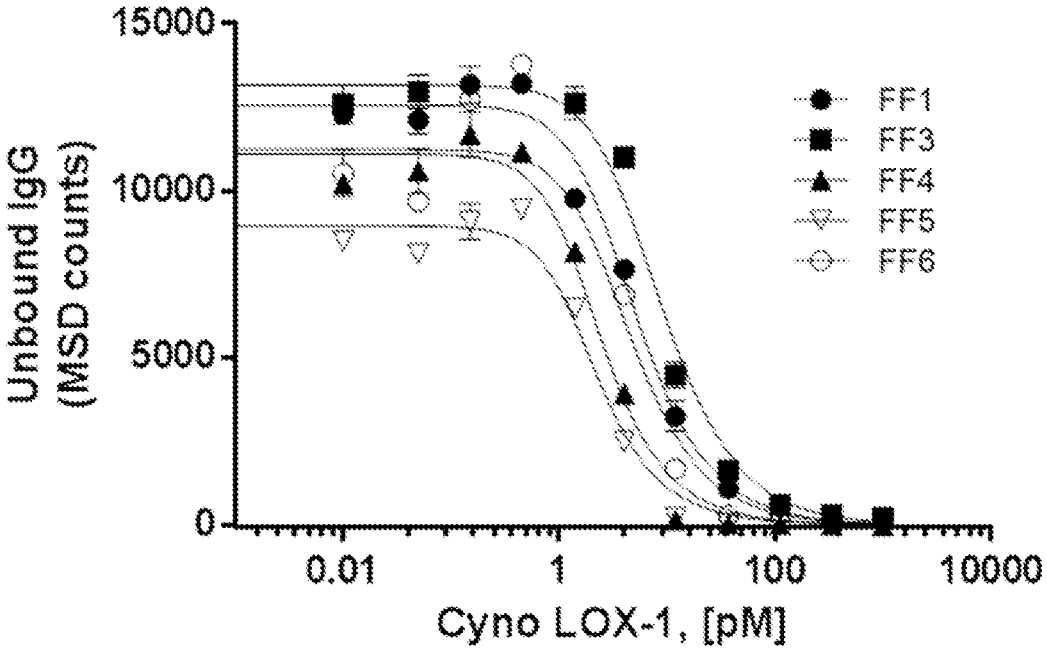

15000
10000
5000
0
Unbound IgG (MSD counts)
0.01
1
100
10000
Cyno LOX-1, [pM]
FF1
FF3
FF4
FF5
FF6

FIG 6B

TRADUCCIÓN OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE ESTÁ ORIGINALMENTE EN INGLÉS

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 Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Miniusticia

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

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

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

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

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

Mi licencia vence el 11 de Marzo de 2009.

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

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

Certificación:

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

Fecha: 12 de Septiembre de 2006.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

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

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

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

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

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

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

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

Zayde Chahin
Jacqueline Chaparro
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Salinas

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

NOVARTIS AG

domiciled in

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:

Arthur Canonica

Pascal Traub

Date/Fecha: June 27, 2006

City,Country/Ciudad,País: Basel, Switzerland

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)

M. Staehelin Notar

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

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)
   This official document
2. is signed by .....
   .....
3. in his/her function as .....
4. and certified by the seal of the .....
   .....

Certified 24. May. 2006

5. in Basel (Bâle) 6. on .....
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt .....
8. no. 2'049'13'389
9. Seal / stamp: 10. Signature:

Heidi Fischer

STATE CHANCERY * BASLE-CITY *

PAT055493-WO-PCT_SL

SEQUENCE LISTING

<110> NOVARTIS AG
IRM LLC

<120> LECTIN-LIKE OXIDIZED LDL RECEPTOR 1 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

<130> PAT055493-WO-PCT

<140> PCT/US2014/043315
<141> 2014-06-20

<150> 61/837,765
<151> 2013-06-21

<160> 147

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 273
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Phe Asp Asp Leu Lys Ile Gln Thr Val Lys Asp Gln Pro Asp
1 5 10 15

Glu Lys Ser Asn Gly Lys Lys Ala Lys Gly Leu Gln Phe Leu Tyr Ser
20 25 30

Pro Trp Trp Cys Leu Ala Ala Ala Thr Leu Gly Val Leu Cys Leu Gly
35 40 45

Leu Val Val Thr Ile Met Val Leu Gly Met Gln Leu Ser Gln Val Ser
50 55 60

Asp Leu Leu Thr Gln Glu Gln Ala Asn Leu Thr His Gln Lys Lys Lys
65 70 75 80

Leu Glu Gly Gln Ile Ser Ala Arg Gln Gln Ala Glu Glu Ala Ser Gln
85 90 95

Glu Ser Glu Asn Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu Ala Arg Lys
100 105 110

Leu Asn Glu Lys Ser Lys Glu Gln Met Glu Leu His His Gln Asn Leu
115 120 125

Asn Leu Gln Glu Thr Leu Lys Arg Val Ala Asn Cys Ser Ala Pro Cys
130 135 140

Pro Gln Asp Trp Ile Trp His Gly Glu Asn Cys Tyr Leu Phe Ser Ser
145 150 155 160

Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Lys Cys Leu Ser Leu Asp
165 170 175

Ala Lys Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Ala Asp Leu Asp Phe Ile Gln
180 185 190

Gln Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu Ser Arg
195 200 205

Arg Asn Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Trp Glu Asp Gly Ser Pro Leu Met
210 215 220

Pro His Leu Phe Arg Val Arg Gly Ala Val Ser Gln Thr Tyr Pro Ser
225 230 235 240

Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Ala Val Tyr Ala Glu Asn Cys
245 250 255

Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu Arg Ala
260 265 270

Gln

<210> 2
<211> 819
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2

atgacttttg atgacctaaa gatccagact gtgaaggacc agcctgatga gaagtcaaat 60

ggaaaaaaag ctaaaggtct tcagtttctt tactctccat ggtggtgcct ggctgctgcg 120

actctagggg tcctttgcct gggattagta gtgaccatta tggtgctggg catgcaatta 180

tcccaggtgt ctgacctcct aacacaagag caagcaaacc taactcacca gaaaaagaaa 240

ctggagggac agatctcagc ccggcaacaa gcagaagaag cttcacagga gtcagaaaac 300

gaactcaagg aaatgataga aacccttgct cggaagctga atgagaaatc caaagagcaa 360

atggaacttc accaccagaa tctgaatctc caagaaacac tgaagagagt agcaaattgt 420

tcagctcctt gtccgcaaga ctggatctgg catggagaaa actgttacct attttcctcg 480

ggctcattta actgggaaaa gagccaagag aagtgcttgt ctttggatgc caagttgctg 540

aaaattaata gcacagctga tctggacttc atccagcaag caatttccta ttccagtttt 600

ccattctgga tggggctgtc tcggaggaac cccagctacc catggctctg ggaggacggt 660

tctcctttga tgccccactt atttagagtc cgaggcgctg tctcccagac ataccttca 720

ggtacctgtg catatataca acgaggagct gtttatgcgg aaaactgcat tttagctgcc 780

ttcagtatat gtcagaagaa ggcaaaccta agagcacag 819

<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Phe Arg Val Arg Gly Ala Val Ser Gln Thr Tyr Pro Ser Gly Thr Cys
1 5 10 15

Ala Tyr Ile

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Asn Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu
1 5 10

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Ser Arg Arg Asn Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Trp Glu
1 5 10

<210> 6
<211> 232

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Glu Phe Arg His Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
1 5 10 15

Trp His Glu Ser Gln Val Ser Asp Leu Leu Thr Gln Glu Gln Ala Asn
20 25 30

Leu Thr His Gln Lys Lys Lys Leu Glu Gly Gln Ile Ser Ala Arg Gln
35 40 45

Gln Ala Glu Glu Ala Ser Gln Glu Ser Glu Asn Glu Leu Lys Glu Met
50 55 60

Ile Glu Thr Leu Ala Arg Lys Leu Asn Glu Lys Ser Lys Glu Gln Met
65 70 75 80

Glu Leu His His Gln Asn Leu Asn Leu Gln Glu Thr Leu Lys Arg Val
85 90 95

Ala Asn Cys Ser Ala Pro Cys Pro Gln Asp Trp Ile Trp His Gly Glu
100 105 110

Asn Cys Tyr Leu Phe Ser Ser Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln
115 120 125

Glu Lys Cys Leu Ser Leu Asp Ala Lys Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr
130 135 140

Ala Asp Leu Asp Phe Ile Gln Gln Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Phe Pro
145 150 155 160

Phe Trp Met Gly Leu Ser Arg Arg Asn Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Trp
165 170 175

Glu Asp Gly Ser Pro Leu Met Pro His Leu Phe Arg Val Arg Gly Ala
180 185 190

Val Ser Gln Thr Tyr Pro Ser Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly
195 200 205

Ala Val Tyr Ala Glu Asn Cys Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Cys Gln
210 215 220

Lys Lys Ala Asn Leu Arg Ala Gln
225 230

<210> 7
<211> 750
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
atgcccctgc tgctgctcct ccccctgctg tgggctggcg ccctggccga gttccggcac 60

ggcctgaacg acatcttcga ggcccagaaa atcgagtggc acgagagcca ggtgtccgat 120

ctgctgaccc aggaacaggc caacctgacc caccagaaga agaagctgga aggccagatc 180

agcgccagac agcaggccga ggaagccagc caggaaagcg agaacgagct gaaagagatg 240

atcgagacac tggcccggaa gctgaacgag aagtccaaag aacagatgga actgcaccac 300

cagaacctga atctgcagga aaccctgaag cgggtcgcca actgcagcgc cccctgcccc 360

caggactgga tctggcacgg cgagaactgc tacctgttca gcagcggcag cttcaactgg 420

gagaagtccc aggaaaagtg cctgagcctg gacgccaagc tgctgaagat caacagcacc 480

gccgacctgg acttcatcca gcaggccatc agctacagca gcttcccttt ctggatgggc 540

ctgagccggc ggaaccccag ctacccttgg ctctgggagg acggcagccc cctgatgccc 600

cacctgttca gagtgcgggg agctgtgagc cagacctacc ccagcggcac ctgtgcctac 660

atccagcgcg gagccgtgta cgccgagaac tgcatcctgg ccgccttcag

catctgccag 720

aagaaggcca atctgcgggc ccagtaataa 750

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 8
Asp Tyr Glu Val His
1 5

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 9
Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 10
Trp Leu Pro Met Asp Tyr
1 5

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 11
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
1 5

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 12
His Pro Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 13
Trp Leu Pro Met Asp Tyr
1 5

<210> 14
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 14
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 15
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttccggcta caccttacc gactacgagg tgcactgggt gcgacaggct 120

ccaggccagg gactggaatg gatgggcgct atccatcctg gctctggcgg cgctgcttac 180

gtgcagaaat tccagggcag agtgaccatg acccgggaca cctctacctc caccgcctac 240

atggaactgt cctccctgcg gagcgacgac accgccgtgt actactgtgc ccggtggctg 300

cccatggact attggggcca gggcaccctc gtgaccgtgt cctct 345

<210> 16
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 16

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 17
<211> 1335
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 17
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttccggcta cacctttacc gactacgagg tgcactgggt gcgacaggct 120

ccaggccagg gactggaatg gatgggcgct atccatcctg gctctggcgg cgctgcttac

180

gtgcagaaat tccagggcag agtgaccatg acccgggaca cctctacctc caccgcctac 240

atggaactgt cctccctgcg gagcgacgac accgccgtgt actactgtgc ccggtggctg 300

cccatggact attggggcca gggcaccctc gtgaccgtgt cctctgcttc taccaagggc 360

ccttccgtgt tccctctggc cccttccagc aagtctacct ctggcggcac cgcagctctg 420

ggctgcctgg tgaaggacta cttccctgag cctgtgacag tgtcctggaa ctctggcgcc 480

ctgaccagcg gagtgcacac cttccctgcc gtgctgcagt cctccggcct gtactccctg 540

tcctccgtgg tgacagtgcc ttcctccagc ctgggcacac agacctacat ctgcaacgtg 600

aaccacaagc cttccaacac caaggtggac aagcgggtgg agcctaagtc ctgcgacaag 660

acccacacct gtcctccatg tcctgcccct gaagccgctg gcggcccttc tgtgtttctg 720

ttccccccaa agcccaagga caccctgatg atctcccgga cccctgaagt gacctgcgtg 780

gtggtggacg tgtcccacga ggatcctgaa gtgaagttca attggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcaca acgccaagac caagcctcgg gaggaacagt acaactccac ctaccgggtg 900

gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagaata caagtgcaag 960

gtgtccaaca aggccctgcc tgcccctatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1020

cctagggaac cccaggtgta caccctgcca cccagccggg aagaaatgac caagaaccag 1080

gtgtccctga cctgtctggt gaagggcttc tacccttccg atatcgccgt ggagtgggag 1140

tctaacggcc agcctgagaa caactacaag accacccctc ctgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tgtactccaa actgaccgtg gacaagtccc ggtggcagca gggcaacgtg
1260

ttctcctgct ctgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acacccagaa gtccctgtcc
1320

ctgtctcccg gcaag 1335

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 18
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp Leu Val
1 5 10

<210> 19

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 19
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 20
Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 21
Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
1 5

<210> 22
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 22
Ala Ala Ser
1

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 23
Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
1 5

<210> 24
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 24
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 25
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 25
gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc gtgtctgctt ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgta gagcctccca gggcatcaac aactggctcg tgtggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgct gcctccagtc tgcagtccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcgccgac tataccctga ccatctccag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacctgatca ccccctacac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 26
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 26
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 27
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 27
gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc gtgtctgctt ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgta gagcctccca gggcatcaac aactggctcg tgtggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgct gcctccagtc tgcagtccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcgccgac tataccctga ccatctccag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacctgatca ccccctacac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccccca
360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa
caacttctac 420

cccagggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg
caacagccag 480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag
caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac
ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc
642

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 28
Asp Tyr Glu Val His
1 5

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 29
Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 30
Trp Leu Pro Met Asp Tyr
1 5

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 31
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
1 5

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 32
His Pro Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 33
Trp Leu Pro Met Asp Tyr
1 5

<210> 34
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 34
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Glu Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 35
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttccggcta cacctttacc gactacgagg tgcactgggt gcgacaggct 120

ccaggccagg gactggaatg gatgggcgct atccatcctg gctctggcgg cgctgcttac 180

gtgcagaaat tccagggcag agtgaccatg acccgggaca cctccatctc caccgcctac 240

atggaactgt cccggctgag atccgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatggctg 300

cccatggact actggggcca gggcacactc gtgaccgtgt cctct
345

<210> 36
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 36
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 37
<211> 1335

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 37
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttccggcta cacctttacc gactacgagg tgcactgggt gcgacaggct 120

ccaggccagg gactggaatg gatgggcgct atccatcctg gctctggcgg cgctgcttac 180

gtgcagaaat tccagggcag agtgaccatg acccgggaca cctccatctc caccgcctac 240

atggaactgt cccggctgag atccgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatggctg 300

cccatggact actggggcca gggcacactc gtgaccgtgt cctctgcttc caccaagggc 360

ccttccgtgt tccctctggc cccttccagc aagtctacct ctggcggcac cgcagctctg 420

ggctgcctgg tgaaggacta cttccctgag cctgtgacag tgtcctggaa ctctggcgcc 480

ctgaccagcg gagtgcacac cttccctgcc gtgctgcagt cctccggcct gtactccctg 540

tcctccgtgg tgacagtgcc ttcctccagc ctgggcacac agacctacat ctgcaacgtg 600

aaccacaagc cttccaacac caaggtggac aagcgggtgg agcctaagtc ctgcgacaag 660

acccacacct gtcctccatg tcctgcccct gaagccgctg gcggcccttc tgtgtttctg 720

ttcccccaa agcccaagga caccctgatg atctcccgga cccctgaagt gacctgcgtg 780

gtggtggacg tgtcccacga ggatcctgaa gtgaagttca attggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcaca acgccaagac caagcctcgg gaggaacagt acaactccac

ctaccgggtg 900

gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagaata caagtgcaag 960

gtgtccaaca aggccctgcc tgcccctatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1020

cctagggaac cccaggtgta caccctgcca cccagccggg aagaaatgac caagaaccag 1080

gtgtccctga cctgtctggt gaagggcttc tacccttccg atatcgccgt ggagtgggag 1140

tctaacggcc agcctgagaa caactacaag accacccctc ctgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tgtactccaa actgaccgtg gacaagtccc ggtggcagca gggcaacgtg 1260

ttctcctgct ctgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acacccagaa gtccctgtcc 1320

ctgtctcccg gcaag 1335

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 38
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp Leu Val
1 5 10

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 39

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 40
Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 41
Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
1 5

<210> 42
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 42
Ala Ala Ser
1

<210> 43
<211> 6
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 43
Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
1 5

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 44
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 45

<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 45
gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc gtgtctgctt ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgta gagcctccca gggcatcaac aactggctcg tgtggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgct gcctccagtc tgcagtccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcgccgac tataccctga ccatctccag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacctgatca ccccctacac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 46
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 46
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 47
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 47
gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc gtgtctgctt ccgtgggcga cagagtgacc
60

atcacctgta gagcctccca gggcatcaac aactggctcg tgtggtatca
gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgct gcctccagtc tgcagtccgg cgtgccctct
180

agattctccg gctctggctc tggcgccgac tataccctga ccatctccag cctgcagccc
240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacctgatca ccccctacac cttcggccag
300

ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccca
360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa
caacttctac 420

cccagggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg
caacagccag 480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag
caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac
ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc
642

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 48
Asp Tyr Glu Val His
1 5

<210> 49

<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 49
Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 50
Trp Leu Pro Met Asp Tyr
1 5

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 51
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
1 5

<210> 52
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 52
His Pro Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 53
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 53
Trp Leu Pro Met Asp Tyr
1 5

<210> 54
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 54
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 55
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 55
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttccggcta cacctttacc gactacgagg tgcactgggt gcgacaggct 120

ccaggccagg gactggaatg gatgggcgct atccatcctg gctctggcgg cgctgcttac 180

gtgcagaaat tccagggcag agtgaccatg acccgggaca cctccatctc caccgcctac 240

atggaactgt cccggctgag atccgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatggctg 300

cccatggact actggggcca gggcacactc gtgaccgtgt cctct 345

<210> 56
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 56
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 57
<211> 1335
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 57
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc

cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttccggcta cacctttacc gactacgagg tgcactgggt gcgacaggct 120

ccaggccagg gactggaatg gatgggcgct atccatcctg gctctggcgg cgctgcttac 180

gtgcagaaat tccagggcag agtgaccatg acccgggaca cctccatctc caccgcctac 240

atggaactgt cccggctgag atccgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatggctg 300

cccatggact actggggcca gggcacactc gtgaccgtgt cctctgcttc caccaagggc 360

ccttccgtgt tccctctggc cccttccagc aagtctacct ctggcggcac cgcagctctg 420

ggctgcctgg tgaaggacta cttccctgag cctgtgacag tgtcctggaa ctctggcgcc 480

ctgaccagcg gagtgcacac cttccctgcc gtgctgcagt cctccggcct gtactccctg 540

tcctccgtgg tgacagtgcc ttcctccagc ctgggcacac agacctacat ctgcaacgtg 600

aaccacaagc cttccaacac caaggtggac aagcgggtgg agcctaagtc ctgcgacaag 660

acccacacct gtcctccatg tcctgcccct gaagccgctg gcggcccttc tgtgtttctg 720

ttccccccaa agcccaagga caccctgatg atctcccgga cccctgaagt gacctgcgtg 780

gtggtggacg tgtcccacga ggatcctgaa gtgaagttca attggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcaca acgccaagac caagcctcgg gaggaacagt acaactccac ctaccgggtg 900

gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagaata caagtgcaag 960

gtgtccaaca aggccctgcc tgcccctatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1020

cctagggaac cccaggtgta caccctgcca cccagccggg aagaaatgac caagaaccag 1080

gtgtccctga cctgtctggt gaagggcttc tacccttccg atatcgccgt ggagtgggag
1140

tctaacggcc agcctgagaa caactacaag accacccctc ctgtgctgga
ctccgacggc 1200

tccttcttcc tgtactccaa actgaccgtg gacaagtccc ggtggcagca gggcaacgtg
1260

ttctcctgct ctgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acacccagaa gtccctgtcc
1320

ctgtctcccg gcaag 1335

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 58
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Thr Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 59
Ala Ala Ser Ile Leu Glu Ser
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 60
Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 61
Ser Gln Gly Ile Thr Asn Trp
1 5

<210> 62
<211> 3

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 62
Ala Ala Ser
1

<210> 63
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 63
Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
1 5

<210> 64
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 64
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Thr Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 65
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 65

gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc gtgtctgctt ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgta gagcctccca gggcatcacc aactggctgg cctggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gcctccatcc tggaatccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgac tataccctga ccatctccag cctgcagccc 240

gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag tacctgatca ccccctacac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 66
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 66

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Thr Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 67
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 67
gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc gtgtctgctt ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgta gagcctccca gggcatcacc aactggctgg cctggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gcctccatcc tggaatccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgac tataccctga ccatctccag cctgcagccc
240

gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag tacctgatca ccccctacac cttcggccag
300

ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccccca
360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa
caacttctac 420

cccagggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg
caacagccag 480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag
caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac
ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc
642

<210> 68
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 68
Asp Tyr Glu Val His
1 5

<210> 69
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 69

Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 70
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 70
Trp Leu Pro Met Asp Tyr
1 5

<210> 71
<211> 7
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 71
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
1 5

<210> 72
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 72
His Pro Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 73
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 73
Trp Leu Pro Met Asp Tyr
1 5

<210> 74
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 74

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 75
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 75
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttccggcta cacctttacc gactacgagg tgcactgggt gcgacaggct 120

ccaggccagg gactggaatg gatgggcgct atccatcctg gctctggcgg cgctgcttac 180

gtgcagaaat tccagggcag agtgaccatg acccgggaca cctccatctc caccgcctac 240

atggaactgt cccggctgag atccgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatggctg 300

cccatggact actggggcca gggcacactc gtgaccgtgt cctct 345

<210> 76
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 76
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 77
<211> 1335
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 77
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttccggcta cacctttacc gactacgagg tgcactgggt gcgacaggct 120

ccaggccagg gactggaatg gatgggcgct atccatcctg gctctggcgg cgctgcttac 180

gtgcagaaat tccagggcag agtgaccatg acccgggaca cctccatctc caccgcctac 240

atggaactgt cccggctgag atccgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatggctg 300

cccatggact actggggcca gggcacactc gtgaccgtgt cctctgcttc caccaagggc 360

ccttccgtgt tccctctggc cccttccagc aagtctacct ctggcggcac cgcagctctg 420

ggctgcctgg tgaaggacta cttccctgag cctgtgacag tgtcctggaa ctctggcgcc 480

ctgaccagcg gagtgcacac cttccctgcc gtgctgcagt cctccggcct gtactccctg 540

tcctccgtgg tgacagtgcc ttcctccagc ctgggcacac agacctacat ctgcaacgtg 600

aaccacaagc cttccaacac caaggtggac aagcgggtgg agcctaagtc ctgcgacaag 660

acccacacct gtcctccatg tcctgcccct gaagccgctg gcggcccttc tgtgtttctg 720

ttcccccccaa agcccaagga caccctgatg atctcccgga cccctgaagt

gacctgcgtg 780

gtggtggacg tgtcccacga ggatcctgaa gtgaagttca attggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcaca acgccaagac caagcctcgg gaggaacagt acaactccac ctaccgggtg 900

gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagaata caagtgcaag 960

gtgtccaaca aggccctgcc tgcccctatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1020

cctagggaac cccaggtgta caccctgcca cccagccggg aagaaatgac caagaaccag 1080

gtgtccctga cctgtctggt gaagggcttc taccttccg atatcgccgt ggagtgggag 1140

tctaacggcc agcctgagaa caactacaag accacccctc ctgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tgtactccaa actgaccgtg gacaagtccc ggtggcagca gggcaacgtg 1260

ttctcctgct ctgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acacccagaa gtccctgtcc
1320

ctgtctcccg gcaag 1335

<210> 78
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 78
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp Leu Val
1 5 10

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 79
Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser
1 5

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 80
Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 81

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 81
Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
1 5

<210> 82
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 82
Ala Ala Ser

<210> 83
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 83
Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
1 5

<210> 84
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 84

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 85
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 85
gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc gtgtctgctt ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgta gagcctccca gggcatcaac aactggctcg tgtggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaaactgct gctgtacgcc gcctccagac tggaatctgg cgtgccctcc 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgac tataccctga ccatctccag cctgcagccc

240

gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag tacctgatca ccccctacac cttcggccag
300

ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 86
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 86
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 87
<211> 642
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 87
gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc gtgtctgctt ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgta gagcctccca gggcatcaac aactggctcg tgtggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaaactgct gctgtacgcc gcctccagac tggaatctgg cgtgccctcc 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgac tataccctga ccatctccag cctgcagccc 240

gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag tacctgatca ccccctacac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttcccccca 360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac 420

cccagggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc 642

<210> 88
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 88
Asp Tyr Glu Val His
1 5

<210> 89
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 89
Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 90
<211> 6

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 90
Trp Leu Pro Ile Asp Tyr
1 5

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 91
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
1 5

<210> 92
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 92
His Pro Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 93
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 93
Trp Leu Pro Ile Asp Tyr
1 5

<210> 94
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 94
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Leu Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 95
<211> 345
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 95
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc
cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttccggcta cacctttacc gactacgagg tgcactgggt gcgacaggct
120

ccaggccagg gactggaatg gatgggcgct atccatcctg gctctggcgg cgctgcttac
180

gtgcagaaat tccagggcag agtgaccatg acccgggaca cctccatctc
caccgcctac 240

atggaactgt cccggctgag atccgacgac accgccgtgt actactgcgc
cagatggctg 300

cccatcgact actggggcca gggcacactc gtgaccgtgt cctct
345

<210> 96
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 96
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Leu Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 97
<211> 1335
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 97
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttccggcta cacctttacc gactacgagg tgcactgggt gcgacaggct 120

ccaggccagg gactggaatg gatgggcgct atccatcctg gctctggcgg cgctgcttac 180

gtgcagaaat tccagggcag agtgaccatg acccgggaca cctccatctc caccgcctac 240

atggaactgt cccggctgag atccgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatggctg 300

cccatcgact actggggcca gggcacactc gtgaccgtgt cctctgcttc caccaagggc 360

ccttccgtgt tccctctggc cccttccagc aagtctacct ctggcggcac cgcagctctg 420

ggctgcctgg tgaaggacta cttccctgag cctgtgacag tgtcctggaa ctctggcgcc 480

ctgaccagcg gagtgcacac cttccctgcc gtgctgcagt cctccggcct gtactccctg 540

tcctccgtgg tgacagtgcc ttcctccagc ctgggcacac agacctacat ctgcaacgtg 600

aaccacaagc cttccaacac caaggtggac aagcgggtgg agcctaagtc ctgcgacaag 660

acccacacct gtcctccatg tcctgcccct gaagccgctg gcggcccttc tgtgtttctg 720

ttcccccccaa agcccaagga caccctgatg atctcccgga cccctgaagt gacctgcgtg 780

gtggtggacg tgtcccacga ggatcctgaa gtgaagttca attggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcaca acgccaagac caagcctcgg gaggaacagt acaactccac ctaccgggtg 900

gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagaata caagtgcaag 960

gtgtccaaca aggccctgcc tgcccctatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1020

cctagggaac cccaggtgta caccctgcca cccagccggg aagaaatgac caagaaccag 1080

gtgtccctga cctgtctggt gaagggcttc tacccttccg atatcgccgt ggagtgggag 1140

tctaacggcc agcctgagaa caactacaag accacccctc ctgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tgtactccaa actgaccgtg gacaagtccc ggtggcagca gggcaacgtg 1260

ttctcctgct ctgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acacccagaa gtccctgtcc 1320

ctgtctcccg gcaag 1335

<210> 98
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 98
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp Leu Val
1 5 10

<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 99
Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser
1 5

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 100
Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 101
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 101

Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
1 5

<210> 102
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 102
Ala Ala Ser
1

<210> 103
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 103
Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
1 5

<210> 104
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 104
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 105
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 105
gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc gtgtctgctt ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgta gagcctccca gggcatcaac aactggctcg tgtggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaaactgct gctgtacgcc gcctccagac tggaatctgg cgtgccctcc 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgac tataccctga ccatctccag cctgcagccc 240

gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag tacctgatca ccccctacac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 106
<211> 214

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 106
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 107
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 107
gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc gtgtctgctt ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgta gagcctccca gggcatcaac aactggctcg tgtggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaaactgct gctgtacgcc gcctccagac tggaatctgg cgtgccctcc 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgac tataccctga ccatctccag cctgcagccc 240

gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag tacctgatca ccccctacac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccca 360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac 420

cccagggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480

gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac

ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc
642

<210> 108
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 108
Asp Tyr Glu Met His
1 5

<210> 109
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 109
Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Ile Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 110
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 110
Trp Leu Pro Met Asp Tyr

1 5

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 111
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
1 5

<210> 112
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 112
His Pro Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 113
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 113
Trp Leu Pro Met Asp Tyr
1 5

<210> 114
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 114
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Ile Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala His
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Trp Leu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 115
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 115
caggtccagc tgcagcagtc aggagccgaa ctggtgcggc ccggagcttc tgtcaaactg 60

agctgcaagg cactgggcta caccttcaca gactatgaga tgcactgggt gaaacagacc 120

cccgtccatg gactggaatg gatcggagca attcaccctg gaagcggagg agcagcttac 180

atccagaagt ttaaagggaa ggcaactctg accgccgaca agagctcctc tacagcccat 240

atggagctga gttcactgac tagcgaagat agcgccgtgt actattgtac ccgctggctg 300

cctatggact attggggaca ggggacttca gtgacagtga gttca 345

<210> 116
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 116
Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 117
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 117
Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr
1 5

<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 118
Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 119
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 119
Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
1 5

<210> 120
<211> 3

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 120
Gly Ala Thr
1

<210> 121
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 121
Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
1 5

<210> 122
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 122
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Tyr Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Gly Leu Gln Thr
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 123
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 123

gatattcaga tgacccagag tagttcttac ctgagcgtgt ccctgggagg aagggtcacc 60

atcacatgca aggcaagcga ccacattaac aattggctgg cctggtacca gcagaaacca 120

ggaaacgcac ctcgactgct gatcagcgga gctacttccc tggagaccgg cgtgccctct 180

agattctctg gaagtggctc agggaaggac tatacactga gcattactgg cctgcagacc 240

gaagatgtcg ctacatacta ttgtcagcag tacctgatta caccctacac tttcggcggc 300

ggaactaaac tggagattaa g 321

<210> 124
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 124
Glu Phe Arg His Gly Leu Asn Asp Ile Phe
1 5 10

<210> 125
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 125
Glu Phe Arg His Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu
1 5 10

<210> 126
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 126
Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ser Gln Val Ser Asp Leu
1 5 10 15

<210> 127
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 127
Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ser Gln Val Ser Asp Leu
1 5 10

<210> 128
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 128
Leu Thr Gln Glu Gln Ala Asn Leu Thr His Gln Lys Lys Lys Leu Glu
1 5 10 15

Gly Gln Ile Ser Ala Arg Gln Gln Ala Glu Glu Ala Ser Gln Glu Ser
20 25 30

Glu Asn Glu Leu Lys Glu
35

<210> 129
<211> 43
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 129
Leu Thr Gln Glu Gln Ala Asn Leu Thr His Gln Lys Lys Lys Leu Glu
1 5 10 15

Gly Gln Ile Ser Ala Arg Gln Gln Ala Glu Glu Ala Ser Gln Glu Ser
20 25 30

Glu Asn Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu
35 40

<210> 130
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 130
Ala Ser Gln Glu Ser Glu Asn Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu
1 5 10 15

<210> 131
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 131
Asn Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu
1 5 10

<210> 132
<211> 15

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 132
Phe Ser Ser Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Lys Cys
1 5 10 15

<210> 133
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 133
Phe Ser Ser Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Lys Cys Leu
1 5 10 15

Ser Leu

<210> 134
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 134
Ile Gln Gln Ala Ile Ser Tyr
1 5

<210> 135
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 135
Ser Arg Arg Asn Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Trp Glu Asp Gly Ser Pro
1 5 10 15

Leu Met Pro His Leu
20

<210> 136
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 136
Trp Glu Asp Gly Ser Pro Leu Met Pro His Leu

1 5 10

<210> 137
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 137
Phe Arg Val Arg Gly Ala Val Ser Gln Thr Tyr Pro Ser Gly Thr Cys
1 5 10 15

Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Ala Val Tyr Ala Glu Asn Cys Ile Leu Ala
20 25 30

Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu Arg Ala Gln
35 40 45

<210> 138
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 138
Tyr Ile Gln Arg Gly Ala Val Tyr Ala Glu Asn
1 5 10

<210> 139
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 139

Ile Gln Arg Gly Ala Val Tyr Ala Glu Asn
1 5 10

<210> 140
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 140
Ala Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu
1 5 10

<210> 141
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 141
Ala Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu Arg Ala Gln
1 5 10 15

<210> 142
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 142
Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu
1 5 10

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

<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 143
Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu Arg Ala Gln
1 5 10

<210> 144
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 144
Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

<210> 145
<211> 6
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
6xHis tag"

<400> 145
His His His His His His
1 5

<210> 146
<211> 232
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 146
Glu Phe Arg His Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
1 5 10 15

Trp His Glu Ser Gln Val Ser Asn Leu Leu Lys Gln Gln Gln Thr Asn
20 25 30

Leu Thr His Gln Lys Asn Lys Leu Glu Gly Gln Ile Ser Ala Arg Gln
35 40 45

Gln Ala Glu Glu Ala Ser Gln Glu Ser Gln Asn Glu Leu Lys Glu Met
50 55 60

Ile Glu Thr Leu Ala Trp Lys Leu Asn Glu Lys Ser Lys Glu Gln Met
65 70 75 80

Glu Leu His His Gln Asn Leu Asn Leu Gln Glu Thr Leu Lys Arg Val
85 90 95

Ala Asn Cys Ser Ala Pro Cys Pro Gln Asp Trp Ile Trp His Glu Glu
100 105 110

Asn Cys Tyr Leu Phe Ser Thr Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln
115 120 125

Glu Lys Cys Leu Ser Leu Asp Ala Lys Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr
130 135 140

Ala Asp Leu Asp Phe Ile Gln Gln Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Phe Pro
145 150 155 160

Phe Trp Met Gly Leu Ser Arg Arg Asn Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Trp
165 170 175

Glu Asp Gly Ser Pro Leu Met Pro His Leu Phe Arg Ile Arg Gly Ala
180 185 190

Val Ser Gln Thr Tyr Pro Ser Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly
195 200 205

Ala Val Tyr Ala Glu Asn Cys Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Cys Gln
210 215 220

Lys Lys Ala Asn Leu Arg Ala Gln
225 230

<210> 147
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
9xHis tag"

<400> 147
His His His His His His His His His
1 5

Resumen

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen al receptor 1 de LDL (lipoproteína de baja densidad) oxidado similar a lectina humana (en lo sucesivo, denominado a veces como "LOX-1"), y composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento que comprenden los mismos.

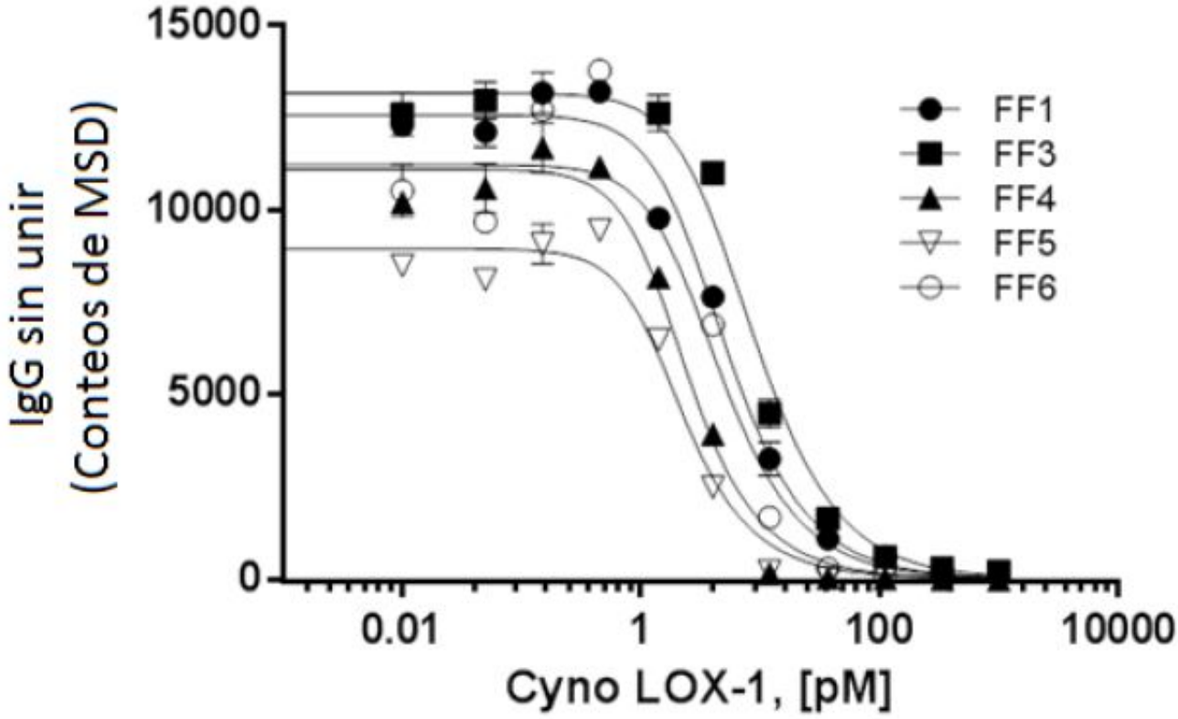

15000
10000
5000
0
IgG sin unir
(Conteos de MSD)
0.01
1
100
10000
Cyno LOX-1, [pM]
FF1
FF3
FF4
FF5
FF6

FIG 6B

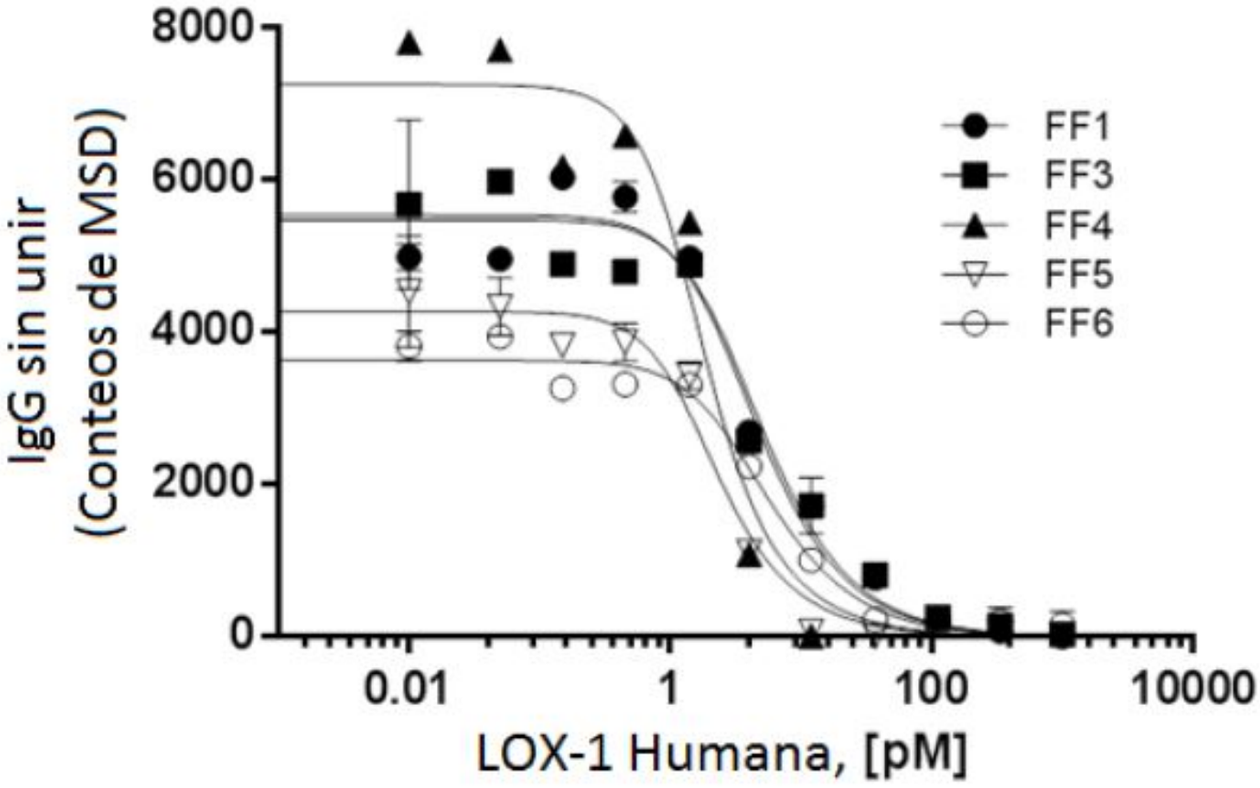

8000
6000
4000
2000
0
IgG sin unir
(Conteos de MSD)
0.01
1
100
10000
LOX-1 Humana, [pM]
FF1
FF3
FF4
FF5
FF6

FIG 6A

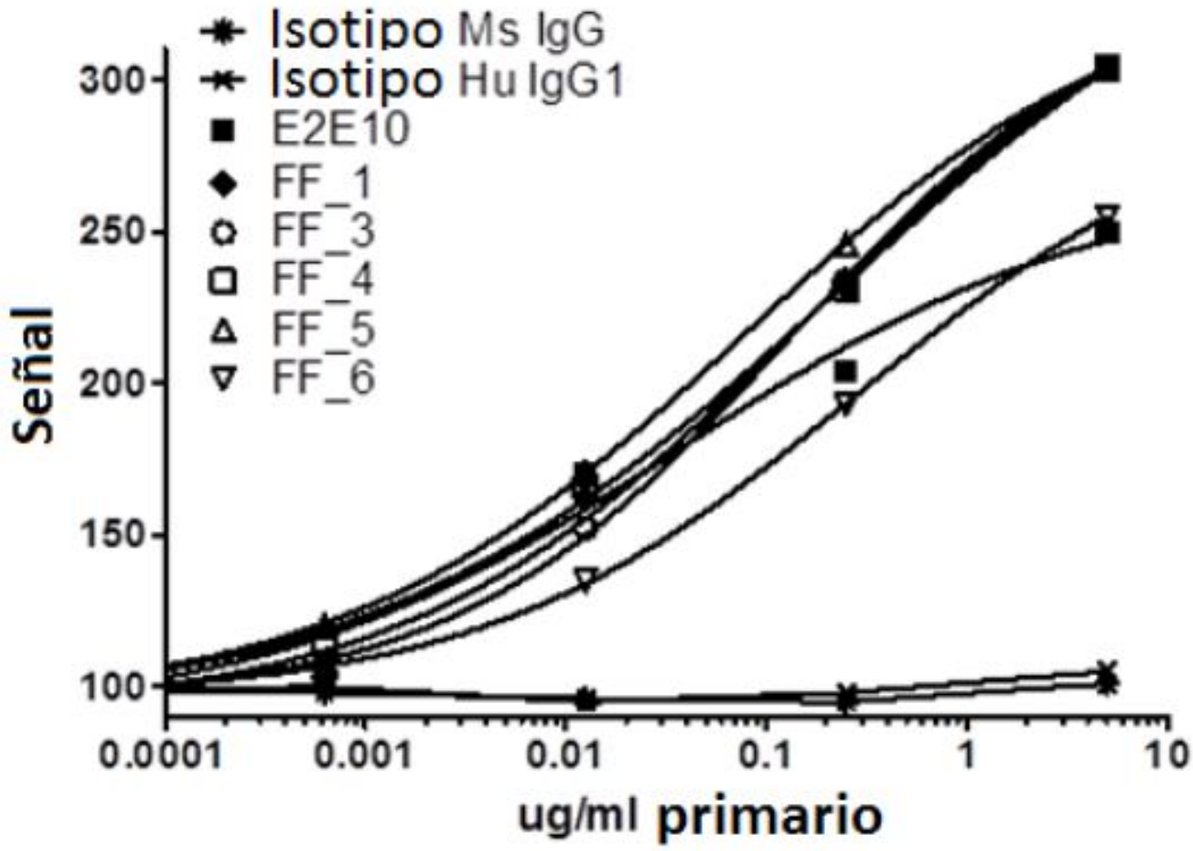

Isotipo Ms IgG
Isotipo Hu IgG1
E2E10
FF_1
FF_3
FF_4
FF_5
FF_6
Señal
300
250
200
150
100
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
ug/ml primario

FIG 5

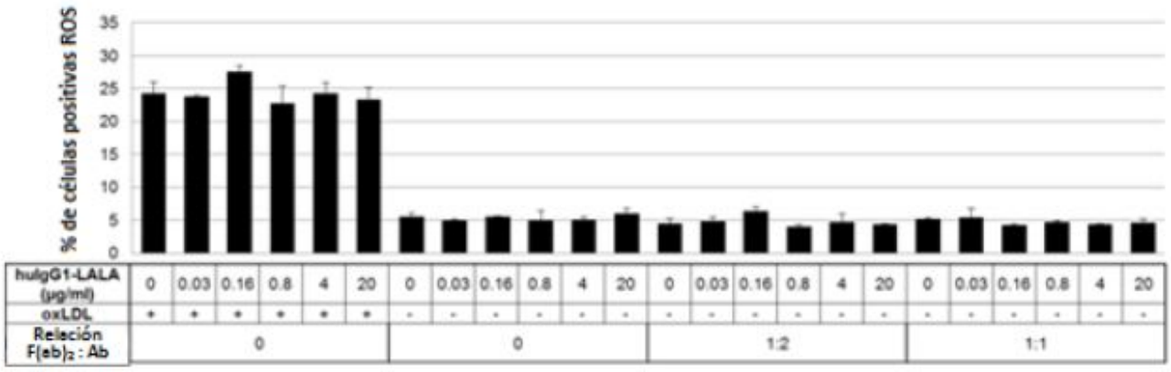

% de células positivas ROS
35
30
25
20
15
10
5
0
huIgG1-LALA (µg/ml)
0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL
+ + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Relación F(ab)2 : Ab
0
0
1:2
1:1

FIG 4F

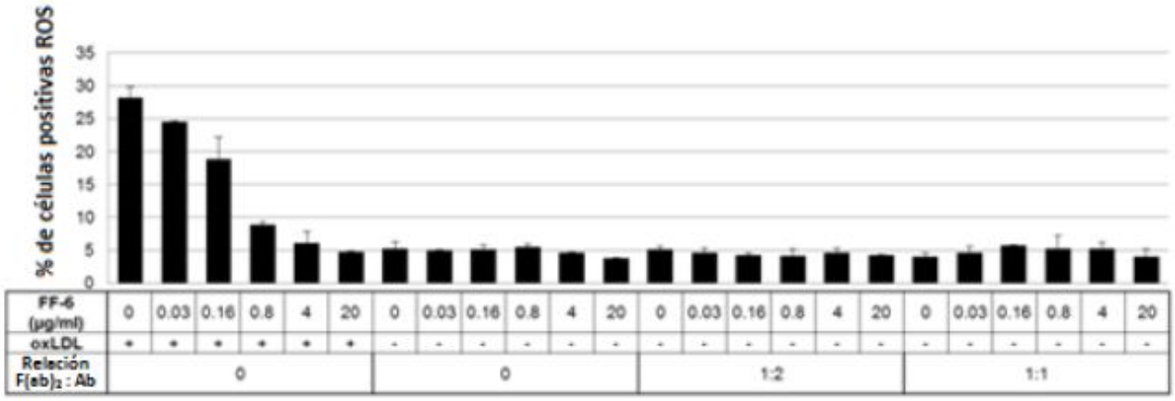

% de células positivas ROS
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-6 (µg/ml) 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL + + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Relación F(ab)2 : Ab 0 0 1:2 1:1

FIG 4E

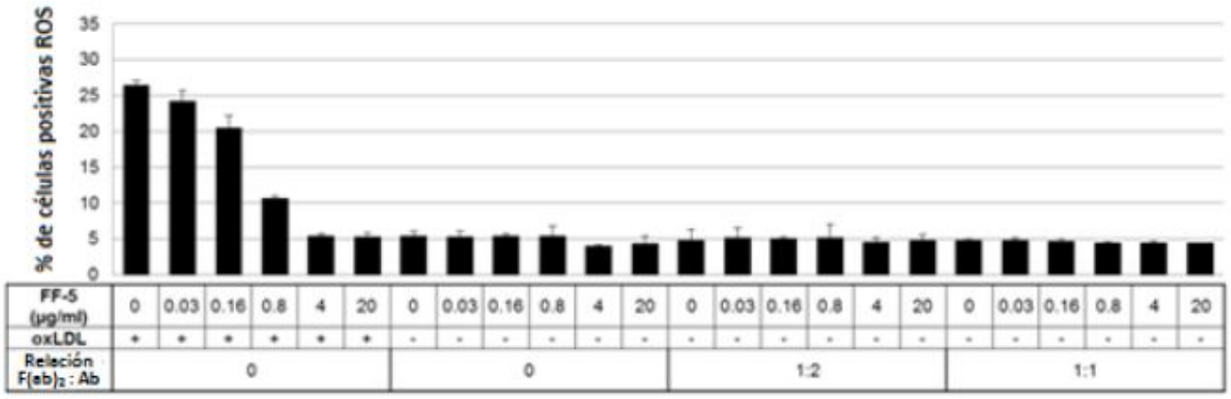

% de células positivas ROS
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-5 (µg/ml)
0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL
+ + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Relación F(ab)2 : Ab
0
0
1:2
1:1

FIG 4D

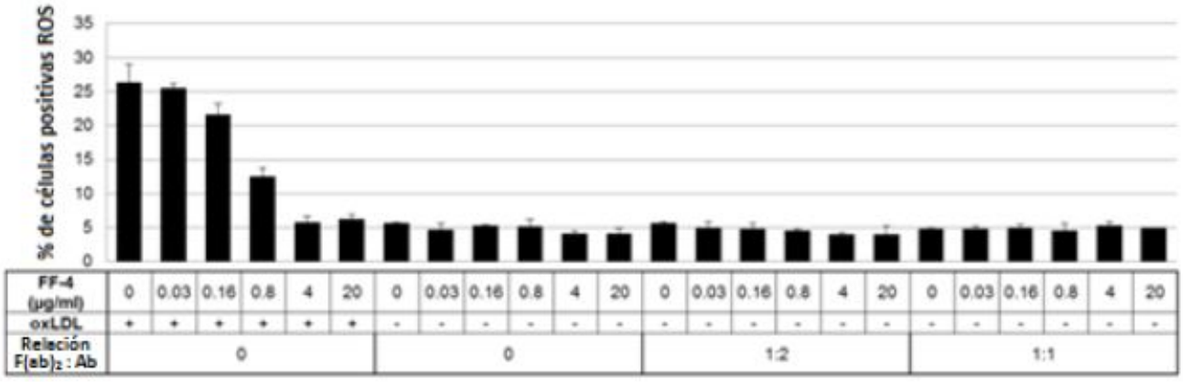

% de células positivas ROS
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-4 (µg/ml)
0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL
+ + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Relación F(ab)2 : Ab
0
0
1:2
1:1

FIG 4C

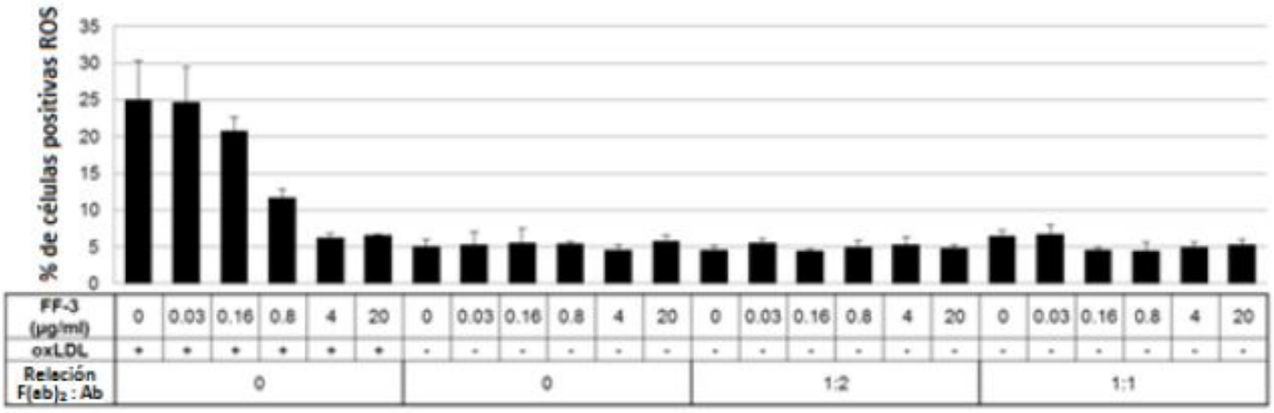

% de células positivas ROS
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-3 (µg/ml)
0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL
+ + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Relación F(ab)2 : Ab
0
0
1:2
1:1

FIG 4B

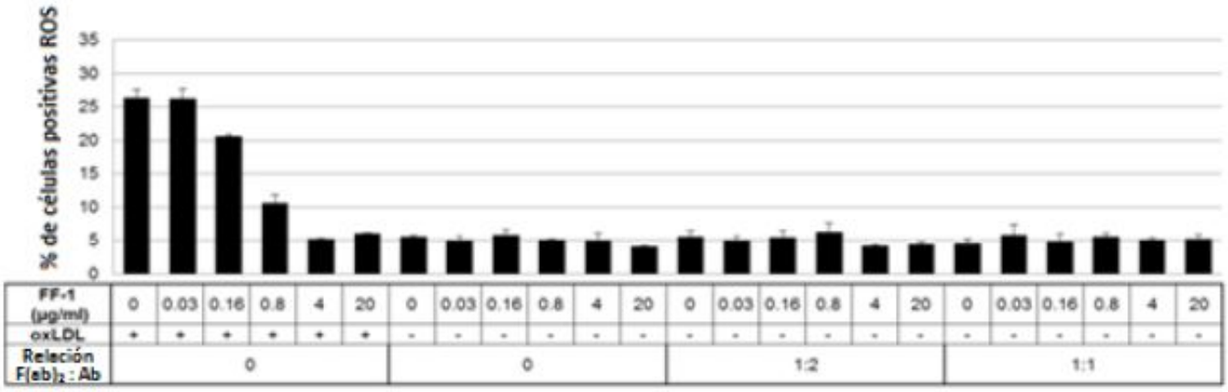

% de células positivas ROS
35
30
25
20
15
10
5
0
FF-1 (µg/ml) 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20 0 0.03 0.16 0.8 4 20
oxLDL + + + + + + - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Relación F(ab)2 : Ab 0 0 1:2 1:1

FIG 4A

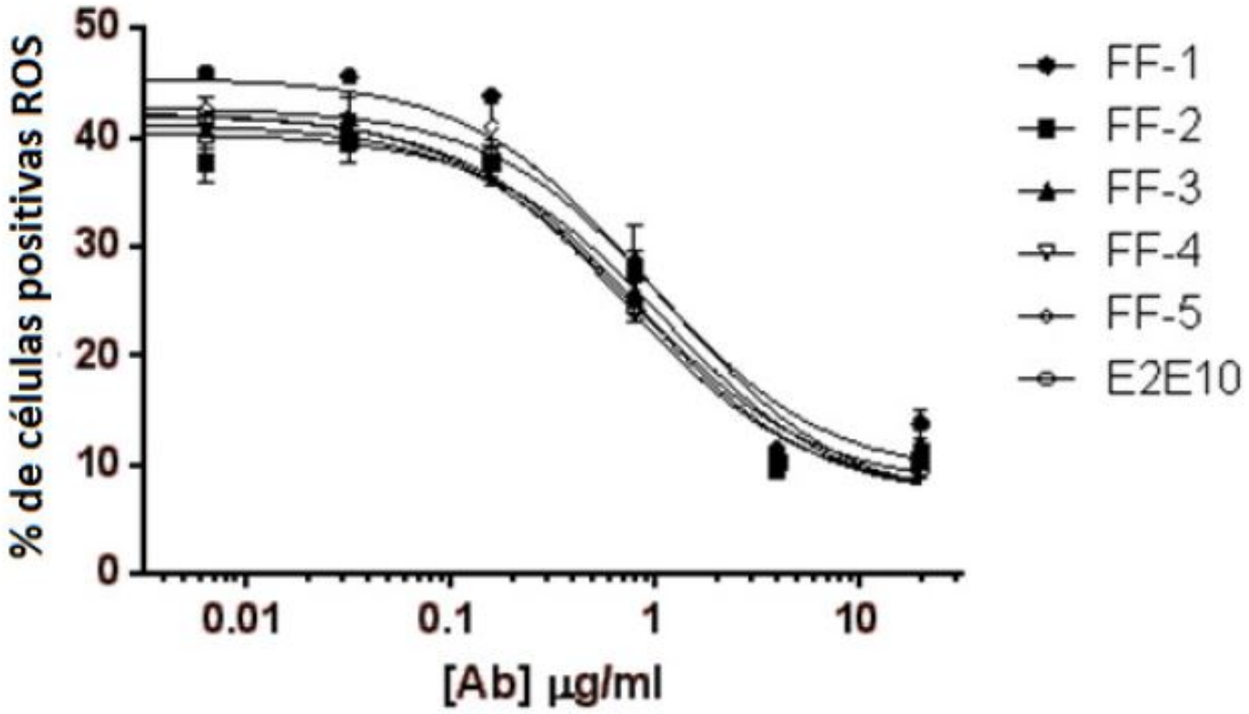

% de células positivas ROS
50
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
[Ab] µg/ml
FF-1
FF-2
FF-3
FF-4
FF-5
E2E10

FIG 3

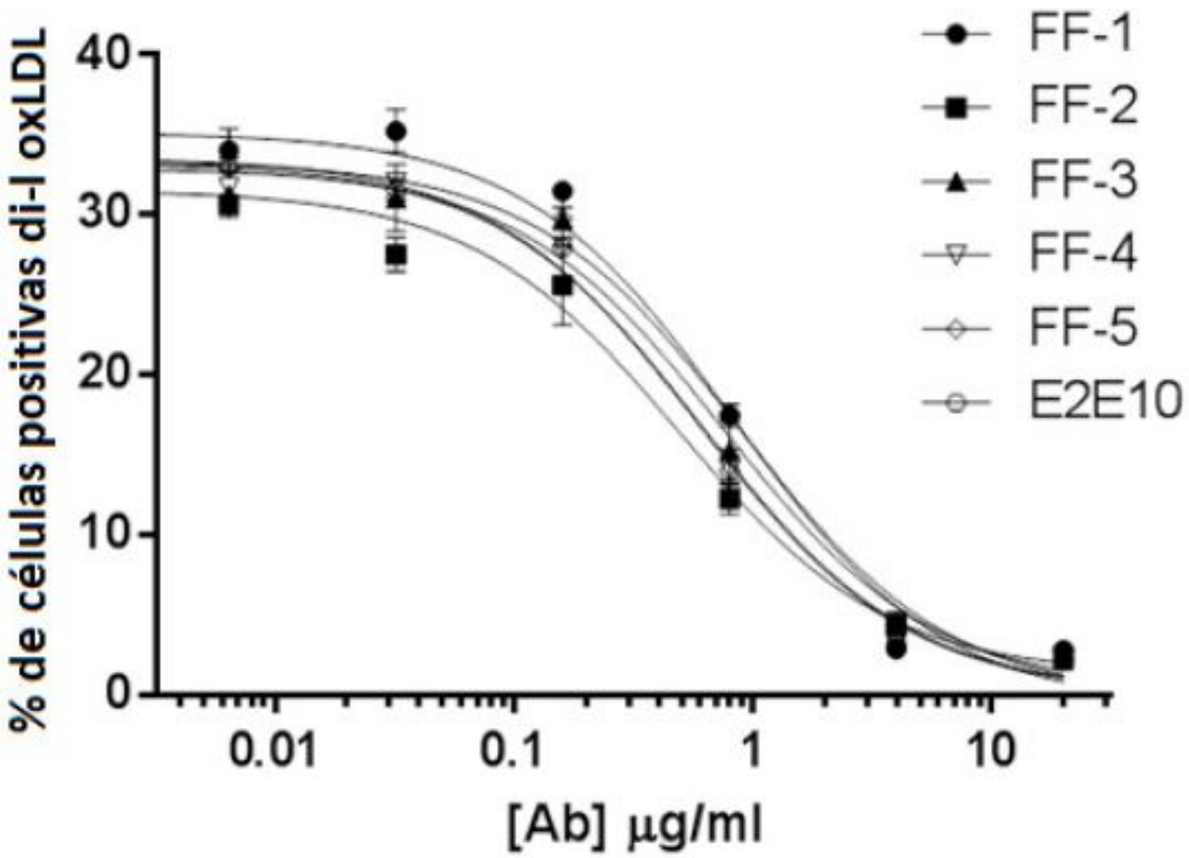

% de células positivas di-I oxLDL
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
[Ab] µg/ml
FF-1
FF-2
FF-3
FF-4
FF-5
E2E10

FIG 2

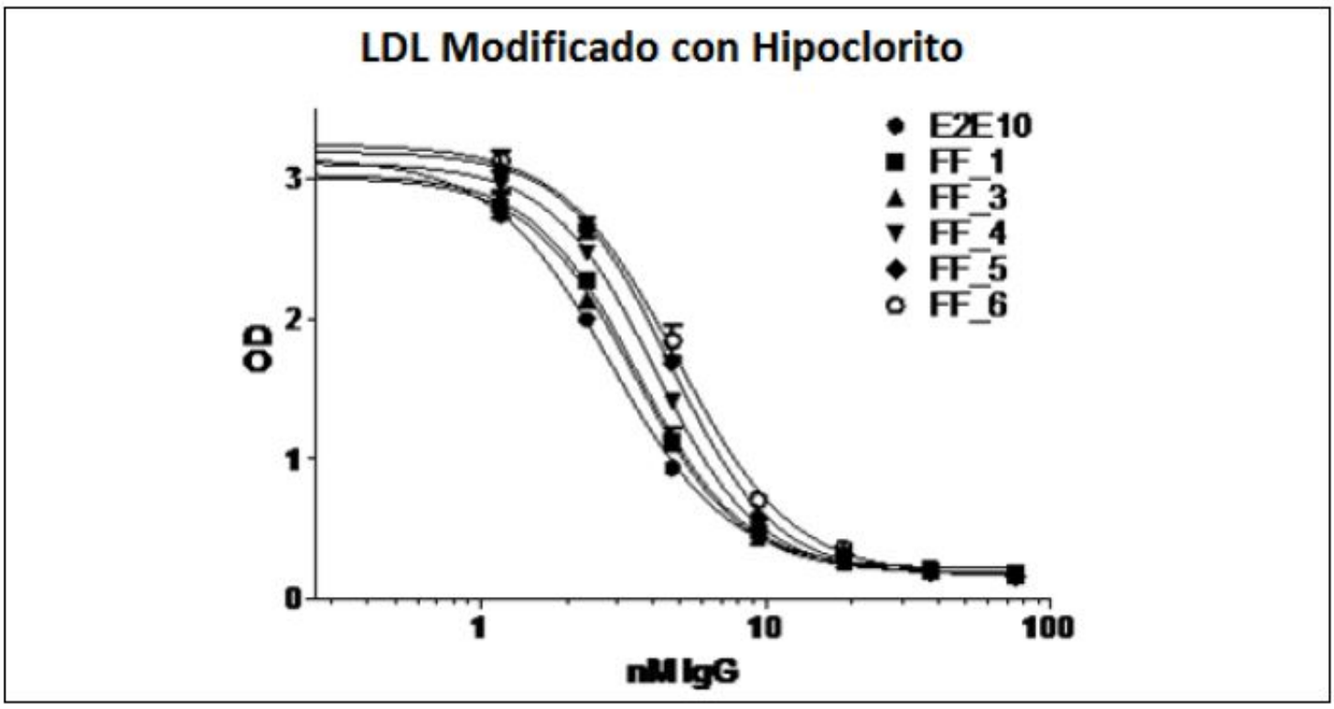

LDL Modificado con Hipoclorito
E2E10
FF_1
FF_3
FF_4
FF_5
FF_6
OD
0
1
2
3
1
10
100
nM IgG

FIG 1C

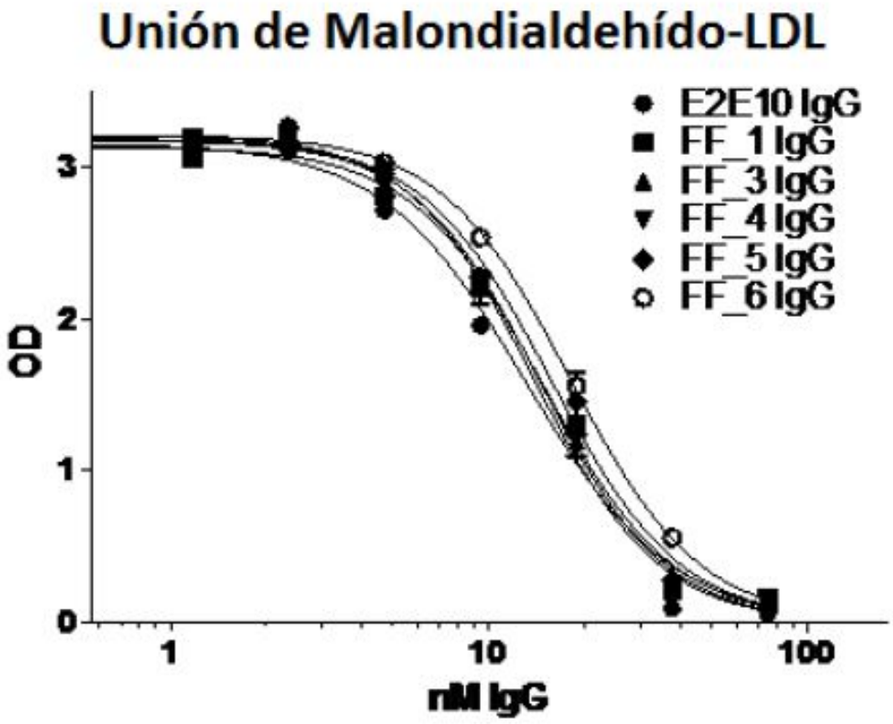

Unión de Malondialdehído-LDL
E2E10 IgG
FF_1 IgG
FF_3 IgG
FF_4 IgG
FF_5 IgG
FF_6 IgG
OD
0
1
2
3
1
10
100
nM IgG

FIG 1B

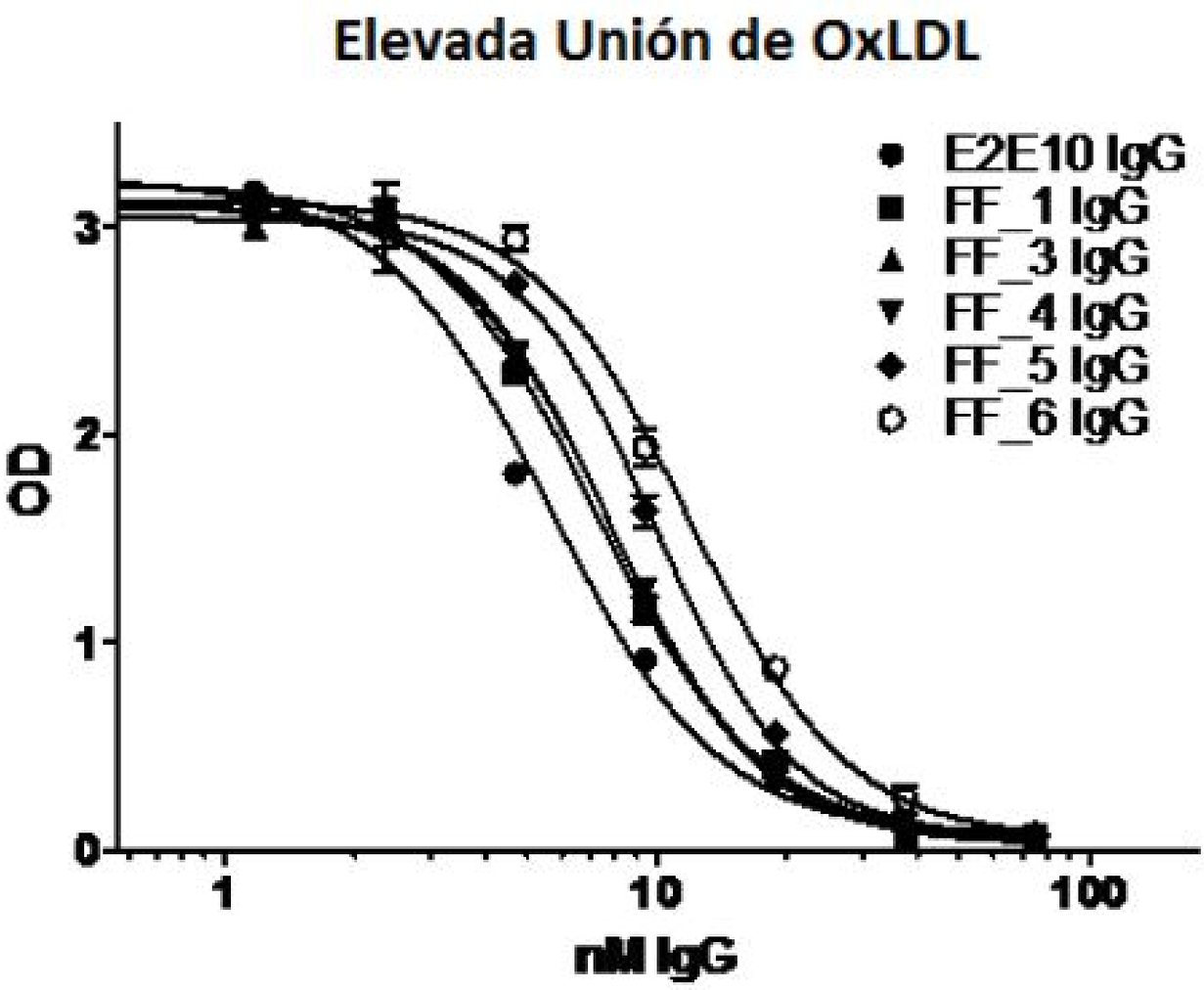

Elevada Unión de OxLDL
E2E10 IgG
FF_1 IgG
FF_3 IgG
FF_4 IgG
FF_5 IgG
FF_6 IgG
OD
3
2
1
0
1
10
100
nM IgG

FIG 1A