ANTICUERPOS ANTI PROTEÍNA SIMILAR A ANGIOPOYETINA 4 Y MÉTODOS DE USO

FUNDAMENTO DE LA INVENCIÓN

La proteína similar a angiopoyetina-4 (ANGPTL4) es miembro de la familia de proteínas secretadas similares a angiopoyetina. Es una proteína homooligomérica, capaz de formar dímeros y tetrámeros, que es expresada por tipos de células que incluyen macrófagos, células adiposas, músculares y hepáticas. ANGPTL4 también se conoce como la proteína hepática relacionada con fibrinógeno/angiopoyetina (HFARP); (Kim et al (2000) Biochem J. 346 603-610.). proteína relacionada con angiopoyetina gamma PPAR (PGAR) (Yoon et al (2000) Mol Cell Biol. 20: 5.343-5349) y factor adiposo inducido por ayuno (FIAF) (Kerten et al (2000) J. Biol. Chem., 275: 28488 a 28493). ANGPTL4 contiene un dominio en espiral N-terminal y un dominio C-terminal similar al de fibrinógeno (FBN) (Kim et al (2000) Biochem J. 346: 603-610).

La lipoproteína lipasa (LPL) tiene un papel central en el metabolismo de las lipoproteínas, que incluye el mantenimiento de los niveles de lipoproteínas en la sangre y, la regulación específica de su actividad a través del tejido. La región de espiral de ANGPTL4 es conocida porque inhibe la depuración de triglicéridos (TG) mediada por la lipoproteína lipasa (LPL). Por lo tanto, en la pérdida de la función de ANGPTL4 por mutaciones (por ejemplo, como se ve en los sujetos humanos), deleciones genéticas (por ejemplo, como se ve en ratones transgénicos), y la inhibición por anticuerpos (por ejemplo, como se ve en ratones y monos cynomolgus) se observada que disminuye los triglicéridos plasmáticos. Además, también se conocen a los anticuerpos ANGPTL4 porque activan a la LPL. Por el contrario, la inyección de ANGPTL4 en ratones produce un rápido aumento en los triglicéridos circulantes y esto es a una velocidad más alta que la inyección de la proteína similar a la angiopoyetina 3 (ANGPTL3) (Yoshida et al (2002) J Lipid Res. 43: 1770-1772).

Los anticuerpos anti-ANGPTL4 y los fragmentos de unión a antígenos descritos en esta invención inician, promueven o potencian la activación de la LPL, por ejemplo, mediante el bloqueo de la inhibición de LPL por ANGPTL4, disminuyendo de ese modo los triglicéridos plasmáticos. Se espera que estos anticuerpos prevengan y

alivien las manifestaciones agudas y crónicas de las enfermedades caracterizadas por niveles elevados de triglicéridos, por ejemplo, dislipidemia primaria, hipertrigliceridemia, síndrome metabólico, diabetes tipo II, y similares.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen a la proteína humana similar a la angiopoyetina-4 (en adelante, referida a veces como "ANGPTL4"), y composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento que comprenden la misma.

Los anticuerpos aislados anti-ANGPTL4, o jlos fragmentos de unión a antígeno, que se describen en el presente documento se unen a ANGPTL4, con una constante de de disociación en equilibrio (K_D) menor o igual a 100 pM. Por ejemplo, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno aquí descritos se pueden unir a ANGPTL4 humana con una K_D menor o igual a 150 nM, menor o igual a 50 nM, menor o igual a 10 nM, menor o igual a 750 pM, menor o igual a 600 pM, menor o igual a 500 pM, menor o igual a 400 pM, menor o igual a 300 pM, menor o igual a 200 pM, menor o igual a 100 pM , menor o igual a 75 pM, menor o igual a 65 pM, menor o igual a 60 pM, menor o igual a 55 pM. Más específicamente, los anticuerpos aislados o los fragmentos de unión a antígeno aquí descritos también pueden unirse ANGPTL4 humana con una K_D menor o igual a 45 pM, como se mide por ensayos cinéticos de unión ForteBio, o menor o igual a 24 pM, como se mide por el ensayo de valoración de la solución en equilibrio (SET); y también pueden unirse a la ANGPTL4 de monos cynomolgus con una K_D menor o igual a 87 pM, como se mide por ensayos cinéticos de unión ForteBio, o menor o igual a 22 pM, medida por SET.

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, o a fragmentos de unión al antígeno del mismo, que se unen a ANGPTL4 humana. La presente invención también se refiere a un anticuerpo aislado, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se unen ANGPTL4 y otros que compiten 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 al antígeno del mismo, que se unen al mismo epítope que un anticuerpo como se describe en la Tabla 1.

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

Los anticuerpos aislados anti-ANGPTL4 y los fragmentos de unión a antígeno aquí descritos pueden ser utilizados para inhibir la unión de ANGPTL4 a la lipoproteína lipasa (LPL) con un CE_{50} menor o igual a 100 nM, menor o igual a 50 nM, menor o igual a 35 nM, menor o igual a 25 nM, menor o igual a 10 nM, o menor o igual a 3 nM.

Los anticuerpos aislados anti-ANGPTL4, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden ser utilizados para reducir los niveles de triglicéridos circulantes (TG).

Los anticuerpos aislados anti-ANGPTL4, o los 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 aislados anti-ANGPTL4, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, como se describe en el presente documento también pueden incluir un marco en el cual un aminoácido ha sido sustituido en el marco del anticuerpo a partir de las respectivas secuencias de la línea germinal humana VH o VL.

Otro aspecto de la invención se incluye un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que tienen la totalidad de las secuencias de cadena pesada y ligera de los anticuerpos humanizados descritos en la Tabla 1. Más específicamente, el anticuerpo aislado o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden tener las secuencias de cadena pesada y ligera de NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318, NEG319.

Un aspecto adicional de la invención se incluye un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que tienen las secuencias del dominio

variable de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos humanizados descritos en la Tabla 1. Más específicamente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno aislado del mismo puede tener las secuencias del dominio variable de la cadena pesada y ligera de NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318, NEG319.

La invención también se refiere a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluyen una CDR1 de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 7, 32, 52, 72, 92, 112, y 132; una CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 8, 33, 53, 73, 93, 113, y 133; y una CDR3 de cadena pesada seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 9, 34, 54, 74, 94, 114, y 134, en donde el anticuerpo aislado o los fragmentos de unión a antígeno del mismo se unen a la ANGPTL4 humana. En otro aspecto, tales anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos incluyen adicionalmente una CDR1 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 17, 42, 62, 82, 102, 122, y 142; una CDR2 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 18, 43, 63, 83, 103, 123, y 143; y una CDR3 de cadena ligera seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 19, 44, 64, 84, 104, 124, y 144.

La invención también se refiere a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluyen una CDR1 de cadena ligera seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 17, 42, 62, 82, 102, 122, y 142; una CDR2 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 18, 43, 63, 83, 103, 123, y 143; y una CDR3 de cadena ligera seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 19, 44, 64, 84, 104, 124, y 144, en donde el anticuerpo aislado o los fragmentos de unión a antígeno del mismo se unen a ANGPTL4 humana.

La invención también se refiere a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo quue se unen a ANGPTL4 que tienen una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 y LCDR1, LCDR2, y LCDR3, en donde las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 7, 8, y 9, y las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 17, 18 y 19; o las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 32, 33, y 34 y las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 42, 43 y 44; o las HCDR1, HCDR2, y HCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 52, 53, y 54, y las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 62, 63, y 64; o las

HCDR1, HCDR2 y HCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 72, 73, y 74, y las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 82, 83, y 84; o las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 92, 93, y 94, y las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 102, 103, y 104; o las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 112, 113, y 114, y las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 122, 123, y 124; o las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 132, 133, y 134, y las LCDR1, LCDR2, LCDR3 comprenden las SEQ ID NOs: 142, 143, y 144.

La invención también se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene una HCDR1, HCDR2, y HCDR3 del dominio variable de la cadena pesada de las SEQ ID NOs: 13, 38, 58, 78, 98, 118, y 138, y las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del dominio variable de cadena ligera de lasSEQ ID NOs: 23, 48, 68, 88, 108, 128, y 148, como se define por Chothia. En otro aspecto de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede tener las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de la secuencia del dominio variable de la cadena pesada de las SEQ ID NOs: 13, 38, 58, 78, 98, 118, y 138, y las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de la secuencia del dominio variable de la cadena ligera de las SEQ ID NOs: 23, 48, 68, 88, 108, 128, y 148, como se definen por Kabat.

En un aspecto de la invención, el anticuerpo aislado o los fragmentos de la unión al antígeno del mismo incluyen una secuencia del dominio variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 13, 38, 58, 78, 98, 118, y 138. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno puede comprender además una secuencia del dominio variable de cadena ligera en la que el dominio variable de la cadena pesada y la cadena ligera del dominio variable se combinan para formar un sitio de unión a antígeno para ANGPTL4. En particular, la secuencia del dominio variable de cadena ligera se puede seleccionar de las SEQ ID NOs: 23, 48, 68, 88, 108, 128, y 148 en donde dicho anticuerpo aislado o los fragmentos de unión a antígeno del mismo se unen a ANGPTL4.

La invención también se refiere a un anticuerpo aislado o los fragmentos de la unión al antígeno del mismo que incluyen una secuencia de dominio variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 23, 48, 68, 88, 108, 128, y 148, en el que dicho anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo se unen a ANGPTL4 humana. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a

antígeno puede comprender además una secuencia de dominio variable de cadena pesada en donde el dominio variable de la cadena ligera y el dominio variable de la cadena pesada se combinan para formar un sitio de unión a antígeno para ANGPTL4.

En particular, el anticuerpo aislado o los fragmentos de la unión al antígeno del mismo que se unen a ANGPTL4, pueden tener dominios variables de cadena pesada y ligera que comprenden las secuencias de las SEQ ID NOs: 13 y 23; 38 y 48; 58 y 68; 78 y 88; 98 y 108; 118 y 128; o 138 y 148, respectivamente.

La invención se refiere además a un anticuerpo aislado o los fragmentos de unión a antígeno del mismo, que incluyen un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 13, 38, 58, 78, 98 , 118, y 138, en el que dicho anticuerpo se une a ANGPTL4. En un aspecto, el anticuerpo aislado o los fragmentos de unión a antígeno del mismo también incluyen un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 23, 48, 68, 88, 108, 128 y 148. 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 refiere a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que tienen un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 23, 48, 68, 88, 108, 128, y 148, en el que dicho anticuerpo se une a ANGPTL4.

En otro aspecto de la invención, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se unen a ANGPTL4 pueden tener una cadena pesada que comprende la secuencia de las SEQ ID NOs: 15, 28, 40, 60, 80, 100, 120, y 140 . El anticuerpo aislado puede incluir también una cadena ligera que se puede combinar con la cadena pesada para formar un sitio de unión a antígeno para ANGPTL4 humana. En particular, la cadena ligera puede tener una secuencia que comprende las SEQ ID NOs: 25, 50, 70, 90, 110, 130, y 150. En particular, anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que se unen ANGPTL4, pueden tener una cadena pesada y una cadena ligera que comprenden las secuencias de las SEQ ID

NOs: 15 y 25; 28 y 25; 40 y 50; 60 y 70; 80 y 90; 100 y 110; 120 y 130; o 140 y 150, respectivamente.

La invención se refiere además a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluyen una cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 15, 28, 40, 60, 80, 100 , 120, y 140, en el que dicho anticuerpo se une a ANGPTL4. En un aspecto, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo también incluyen una cadena ligera que tiene al menos 90% identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 25, 50, 70, 90, 110, 130, y 150.

La invención se refiere además a un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que incluyen una cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 25, 50, 70, 90, 110, 130 y 150, en el que dicho anticuerpo se une a ANGPTL4.

La invención se refiere además a un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno aislado que compiten por la unión con los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno aquí descritos, por ejemplo, con anticuerpos NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318, y NEG319 humanizados. En una modalidad, el anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno de la invención es capaz de inhibir en más de un 50% la unión de ANGPTL4 por un anticuerpo humanizado seleccionado entre NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318, y NEG319, cuando los dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno están presentes en concentraciones equimolares.

En otra modalidad, anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del mismo es capaz de inhibir en más de un 80% la unión de ANGPTL4 por un anticuerpo humanizado seleccionado de NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318, y NEG319, cuando los dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno están presentes en concentraciones equimolares. En aún otras modalidades, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de la invención es capaz de inhibir en más de un 85% (o 90%, 95%, 98% o 99%) la unión de ANGPTL4 a un anticuerpo humanizado seleccionado de NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310,

NEG313, NEG315, NEG318, y NEG319, cuando los dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno están presentes en concentraciones equimolares.

La invención también se refiere a composiciones que comprenden al anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se describen en este documento. Así como, a las 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 a antígeno del mismo de la Tabla 1, tales como, por ejemplo, los anticuerpos humanizados NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318, NEG319. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación de dos o más de los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno del mismo de la Tabla 1.

La invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica el dominio variable de la cadena pesada que tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID NOs: 13, 38, 58, 78, 98, 118, y 138. En particular, el ácido nucleico tiene una secuencia de al menos 90% identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 14, 27, 39, 59, 79, 99, 119, y 139. En un aspecto adicional de la invención, la secuencia es de las SEQ ID NOs: 14, 27, 39, 59, 79, 99, 119 o 139.

La invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica el dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID NOs: 23, 48, 68, 88, 108, 128, y 148. En particular, el ácido nucleico tiene una secuencia de al menos 90% identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 24, 31, 49, 69, 89, 109, 129, y 149. En un aspecto adicional de la invención, la secuencia es de las SEQ ID NOs: 24, 31, 49, 69, 89, 109, 129 o 149.

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 en las SEQ ID NOs: 23, 48, 68, 88, 108, 128, y 148.

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 hospedera 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 donde dichas secuencias de ADN están unidas operativamente a un promotor y son capaces de ser expresados en la célula hospedera. Se contempla que el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado. También se contempla que la célula hospedera es una célula de mamífero no humano.

Se contempla que la célula es una célula humana. Además se contempla que la célula está en un sujeto. En una modalidad, se contempla que la célula es una célula endotelial. En otras modalidades, la célula puede ser una o más entre una célula adiposa, múscular y hepática. Todavía se contempla además que el sujeto sea humano.

La invención también se refiere a un procedimiento para tratar, mejorar, o prevenir un trastorno asociado a ANGPTL4 en un paciente, en donde el método incluye la etapa de administrar al paciente una cantidad eficaz de una composición que comprende el anticuerpo o los fragmentos de unión a antígenos del mismo descritos en este documento. En un aspecto, el trastorno asociado a ANGPTL4 está asociada con hipertrigliceridemia (por ejemplo, hipertrigliceridemia severa (por ejemplo, con la concentración de triglicéridos en plasma > 500 mg/dL), hipertrigliceridemia asociada con la obesidad e hipertrigliceridemia tipo V). En otros aspectos, el trastorno asociado a ANGPTL4 se asocia con dislipidemia primaria, síndrome metabólico, diabetes tipo II. Se contempla que el paciente es humano.

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

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 con experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención.

Los términos "proteína ANGPTL4" o "antígeno ANGPTL4" o "ANGPTL4" se utilizan indistintamente, y se refieren a la proteína similar a angiopoyetina 4 (ANGPTL4) en diferentes especies. Por ejemplo, ANGPTL4 humana tiene la secuencia tal como se establece en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1), y se ha descrito en informes anteriores y en la literatura (Nature, vol 386, p 73-77, 1997; Genomics, Vol. 54, No. 2, p 191-199, 1998;. Biochem J., Vol 339, Parte 1, P. 177-184, 1999;. GenBank Nº de acceso NP 002534). ANGPTL4 contiene un dominio de espiral N-terminal y un dominio C-terminal similar al de fibrinógeno (FBN) (Kim et al (2000) Biochem J. 346: 603-610). Es una proteína homooligomérica, capaz de formar dímeros y tetrámeros, que es expresada en tipos de células que incluyen macrófagos, células adiposas, musculares y células del hígado, y se sabe que inhibe a depuración de triglicéridos (TG) mediada por la lipoproteína lipasa (LPL).

Además, en el contexto de esta invención, el término "ANGPTL4" incluye mutantes de la proteína natural similar a angiopoyetina-4 (ANGPTL4), que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la de la estructura primaria nativa (secuencia de aminoácidos) que se describe en los informes mencionados anteriormente. Aquí, el término "mutantes de la proteína natural similar a angiopoyetina-4 (ANGPTL4) que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos" se refiere a tales proteínas mutantes.

El término "anticuerpo" como se usa en este documento significa un anticuerpo entero y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o de cadena única de los mismos. Un anticuerpo completo es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) inter-conectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta 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 por 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 son las regiones más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino-terminal al carboxi-terminal

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 interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos del hospedero o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y al primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.

El término "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, como se usa aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno dado (por ejemplo, el receptor humano de LDL oxidado (ANGPTL4)). Las funciones de unión a antigeno de un anticuerpo pueden ser realizada por fragmentos de un anticuerpo intacto. Ejemplos de los fragmentos abarcados dentro del término fragmento de unión a antígeno o porción de unión a antígeno de un anticuerpo de unión incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un $F(ab)_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de dominio único (dAb) (Ward et al, 1989 Nature 341: 544-546), que consiste en 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 péptido artificial que les permite ser hechos como una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocido como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al, 1988 Science 242: 423-426; y Huston et al, 1988 Proc Natl Acad Sci. 85: desde 5879 hasta 5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla incluyen una o más porciones o fragmentos de unión a antígeno 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 su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Los fragmentos de unión al antígeno también se pueden incorporar a los anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos,

triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126 -1,136). Las porciones de unión a antígeno de los anticuerpos pueden ser injertadas en estructuras basados en polipéptidos tales como fibronectina tipo III (Fn3) (véase la patente US. No. 6.703.199, que describe monocuerpos polipeptídicos de fibronectina).

Los fragmentos de unión a antígeno se pueden incorporar en moléculas de cadena sencilla que comprenden un par de segmentos de Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementaria, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata et al., 1995 Protein Eng. 8 (10): 1057-1062; y Patente de EE.UU. No. 5.641.870).

Tal como se utiliza aquí, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en los sitios antigénicos individuales. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del anticuerpo "brazo" interactúa a través de fuerzas débiles no covalentes con el antígeno en numerosos sitios; a más interacciones, más fuerte es la afinidad. Tal como se utiliza aquí, el término "alta afinidad" por un anticuerpo o por los 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 aminoácidos de origen natural y sintético, así como a 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. Los 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 a un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio metionina. 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. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido de origen natural.

El término "especificidad de unión", como se usa aquí se refiere a la capacidad de un sitio de combinación de los anticuerpos individuales para reaccionar solamente con un determinante antigénico.

La frase " se une específicamente (o selectivamente) " a un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de unión a ANGPTL4-) se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de un antígeno afín (por ejemplo, una ANGPTL4 humana o ANGPTL4 de cynomolgus) en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno."

El término "mediada por ANGPTL " se refiere al hecho de que ANGPTL4 es conocida por inhibir a la depuracipon de triglicéridos (TG) mediada por la lipoproteína lipasa (LPL), y por lo tanto aumentar los niveles de triglicéridos.

Un "trastorno asociada a ANGPTL4 ", "condición asociada a ANGPTL4," o términos similares, como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier número de condiciones o enfermedades en las que se busca la modulación de la lipoproteína ANGPTL4ANGPTL4 por una reducción de la inhibición de LPL mediada por ANGPTL4. Estas condiciones incluyen, pero no se limitan a aquellas que involucran el metabolismo de lípidos, tales como hiperlipidemia, hiperlipoproteinemia y dislipidemia, incluyendo dislipidemia aterogénica, dislipidemia diabética, hipertrigliceridemia (por ejemplo, la hipertrigliceridemia severa (por ejemplo, con la concentración de triglicéridos en plasma> 500 mg/dL), hipertrigliceridemia asociada con la obesidad e hipertrigliceridemia tipo V), la hipercolesterolemia, la quilomicronemia, dislipidemia mixta (obesidad, síndrome metabólico, diabetes, etc.), lipodistrofia, lipoatrofia, y otras condiciones causadas por, por ejemplo, disminución de la actividad de LPL y/o deficiencia de LPL, disminución de la actividad del receptor LDL y/o la deficiencia de receptor de LDL, Apo C2 alterada, deficiencia de ApoE, el aumento de ApoB, aumento de la producción y/o disminución de la eliminación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), determinado tratamiento de fármacos (por ejemplo, dislipidemia inducida por el tratamiento con glucocorticoides), cualquier predisposición genética, la dieta, el estilo de vida, y similares.

Otras enfermedades asociadas a ANGPTL4 o trastornos asociados con o resultante de la hiperlipidemia, hiperlipoproteinemia, y/o dislipidemia, incluyen, pero no

se limitan a, enfermedades o trastornos cardiovasculares, tales como aterosclerosis, aneurisma, hipertensión, angina, accidente cerebrovascular, enfermedades cerebrovasculares, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedades de las arterias coronarias, infarto de miocardio, enfermedades vasculares periféricas, y similares; pancreatitis aguda; esteatohepatitis no alcohólica (EHNA); trastornos de azúcar en la sangre, como la diabetes; obesidad, y similares.

El término "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, sustituye o intercambia para que el sitio de unión al antígeno (región variable) esté unido a una región constante de una clase diferente o alterada, función efector 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 porción de la misma, está 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 con 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 que tiene antigenicidad reducida en humanos en comparación con el anticuerpo original de ratón.

El término "variante modificada de forma conservadora" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a las secuencias particulares de ácidos nucleicos, las variantes modificadas de manera conservadora se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, 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 todos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, el codón puede ser alterado 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 conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en este documento 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 ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Para las secuencias de polipéptidos, las "variantes modificadas de manera conservadora" incluyen sustituciones individuales, deleciones o adiciones a una secuencia de polipéptido que dan como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservadora se suman a y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecie y alelos de la invención. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras 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 conservativas de secuencia " se usan para referirse a las modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos.

El término "epítope" significa una proteína determinante capaz de unirse a un anticuerpo específico. Los epítopes consisten habitualmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características específicas de carga. Los epítopes conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión al primer, pero no al último se pierde en presencia de disolventes de desnaturalización.

El término "anticuerpo humano", como se usa aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto el marco y las regiones CDR se derivan a partir de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante se deriva también de tales secuencias humanas,

por ejemplo, secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de las secuencias de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo).

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo que retiene la reactividad específica de antígeno de un anticuerpo no humano, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón, mientras que es menos inmunogénico cuando se administra como un agente terapéutico en seres humanos. Véase, por ejemplo, Robello et al, Transplantation, 68:. 1417-1420. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la retención de las regiones de unión a antígeno no humanas y la sustitución de las partes restantes del anticuerpo con sus homólogos humanos (es decir, la región constante así como porciones de la región variable no implicadas en la unión). Véase, por ejemplo, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81: 6851 a 6855, 1984; Morrison y Oi, Adv. Immunol, 44: 65-92, 1989;. Verhoeyen et al, Science, 239:. 1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28: 489-498, 1991; y Padlan, Molec. Immun., 31: 169-217, 1994. Otros ejemplos de la tecnología de la ingeniería humana incluyen, pero no se limitan a la tecnología Xoma que se divulga en US 5.766.886.

Los términos "identidad", porcentaje de "identidad" o en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren 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, la identidad de 60%, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% de identidad sobre una región determinada, o, cuando no se especifica, sobre toda la secuencia), cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o por alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que es al menos aproximadamente de 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferiblemente sobre una región que es de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más amino ácidos) de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, a la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se

usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros de programa de algoritmo de secuencia. Los parámetros del programa por defecto se pueden utilizar, o pueden ser designados parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa aquí, incluye la referencia a un segmento de cualquier número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste de 20 a 600, por lo general aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean de manera óptima. Los métodos de alineación de secuencias para su comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Matemáticas. 2: 482C, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970, por la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU. 85: 2444, 1988, mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou ed., 2003)).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402, 1977; y Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et

al., Supra). Estos aciertos de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. Las palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en cuanto a la puntuación de alineamiento acumulativo se puede aumentar. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos 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 aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. 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 cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 89: 10 915, 1989) alineaciones (B) de 50, la expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 90:. De 5873 hasta 5787, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual 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 menor probabilidad de suma 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 aún 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) versión que ha sido incorporada en el programa ALIGN (2,0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de

hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol, Biol 48.: 444-453, 1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en la world wide web en gcg.com), utilizando ya sea una matriz de flor de 62 o una matriz PAM250, y un enalidad de diferencia de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Aparte del porcentaje de identidad de secuencia que se señaló 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 es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con los anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe abajo. Por lo tanto, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solamente por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Sin embargo, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico 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 especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente ANGPTL4 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de ANGPTL4). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a ANGPTL4 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material y/o productos químicos celulares.

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

El término "K_{asoc}" o "k_a", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término "k_{dis}" o "K_D", como se usa aquí, pretende referirse a la tasa de disociación de una particular interacción anticuerpo-antígeno. El término "K_D", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de k_d a k_a (es decir k_d/k_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_d para los anticuerpos pueden determinarse usando métodos bien establecidos en la técnica. Los métodos para determinar la K_D de un anticuerpo incluyen la medición de la resonancia del plasmón superficial utilizando un sistema de biosensor tal como un sistema Biacore®, o la medición de afinidad en solución mediante valoración de la solución de equilibrio (SET).

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utilizan aquí, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad de unión y afinidad para un epítope particular.

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

A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular abarca implícitamente también variantes modificadas de manera conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degeneradas) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, como se detalla a continuación, las sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir mediante la generación de secuencias en las que se selecciona más la tercera posición de uno o (o todos) los codones que están sustituidos con base mixta

y/o residuos desoxiinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res . 19: 5081, 1991; Ohtsuka et al J. Biol Chem 260,: 2605-2608, 1985; y Rossolini et al, Mol Cell Probes 8: 91-98, 1994).

El término "unido operativamente" se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de polinucleótidos (por ejemplo, ADN). Típicamente, el término se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora de la transcripción a una secuencia transcrita. Por ejemplo, un promotor o secuencia intensificadora está unido operativamente a una secuencia codificante si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula hospedera apropiada u otro sistema de expresión. Generalmente, las secuencias reguladoras del promotor transcripcional que se unen operativamente a una secuencia transcrita están físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es decir, son cis-actrices. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras de la transcripción, tales como las potenciadores, no necesitan ser físicamente contigua o situada en estrecha proximidad a las secuencias codificantes cuya transcripción potencian.

Tal como se utiliza aquí, el término, "optimizado" significa que una secuencia de nucleótidos ha sido alterada para codificar una secuencia de aminoácidos utilizando codones que son preferidos en la célula u organismo de producción, 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 está 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 "parental". Las secuencias optimizadas en este documento han sido diseñadas para tener los codones son preferidos en 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 las secuencias de nucleótidos optimizadas también se conocen como optimizadas.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento 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 son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de origen natural de aminoácidos y polímero de aminoácido de

origen no natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de polipéptido abarca también implícitamente a las variantes conservadoramente modificadas de la misma.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa aquí, 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 transcromosómico para los genes de la inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado de la misma, anticuerpos aislados de una célula hospedera 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 implican empalme de la totalidad o una porción de un gen de inmunoglobulina humana, a secuencias de otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que el marco y las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática in vivo) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

El término "célula hospedera recombinante" (o simplemente "célula hospedera") se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector recombinante de expresión. Se debe entender que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula particular sino a la progenie de tal célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún así se incluyen dentro del alcance de la expresión "célula hospedera" como se usa en el presente documento.

El término "sujeto" incluye animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados (por ejemplo: los mamíferos y no mamíferos), tales como, primates no humanos (por ejemplo: macaco), ovejas, perros, vacas,

pollos, anfibios y reptiles. Excepto cuando se indique, los términos "paciente" o "sujeto" se utilizan aquí de forma intercambiable. Tal como se utiliza aquí, los términos "CYNO" o "cynomolgus" se refieren a el mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*).

Tal como se utiliza aquí, el término "tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno (por ejemplo, trastorno asociado a ANGPTL4) se refiere en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, ralentizar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra modalidad "tratar" o "tratamiento" se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico incluyendo aquellos que pueden no ser discernibles por el paciente. En aún otra modalidad, "tratar" o "tratamiento" se refiere a la modulación de la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente, (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico), o ambos. En aún otra modalidad, "tratar" o "tratamiento" se refiere a prevenir o retrasar la aparición o el desarrollo o la progresión de la enfermedad o trastorno.

"Prevención" en lo que respecta a las indicaciones que se describen en este documento, incluyendo, por ejemplo, trastorno de asociado a ANGPTL4, significa cualquier acción que impide o retrasa un empeoramiento en, por ejemplo, parámetros de la enfermedad asociada aANGPTL4, como se describe a continuación, en un paciente con riesgo de dicho empeoramiento.

El término "vector" pretende referirse a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que los segmentos adicionales de ADN se pueden ligar. Otro tipo de vector es un vector viral, tal como un vector viral adeno-asociado (AAV, o AAV2), en el que los segmentos adicionales de ADN se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedera en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedera tras la introducción en la célula hospedera, y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedero. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan aquí como "vectores recombinantes de expresión " (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 otras formas tales de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que sirven para funciones equivalentes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1A-1D representa la inversión de la inhibición mediada por ANGPTL4 de la proteína humana lipoproteína lipasa (LPL) por los anticuerpos ANGPTL4 seleccionados de la invención.

La Figura 2 representa la unión de los anticuerpos seleccionados de la invención a ANGPTL4 humana de longitud completa y dominio en espiral N-terminal de la ANGPTL4 humana, y la ausencia de unión a ANGPTL3 humana de longitud completa. ANGPTL3 Ab = anticuerpo de referencia-ANGPTL3 específico.

Las Figuras 3A-3B representa los cambios en los niveles de triglicéridos en plasma en ratones transgénicos ANGPTL4 humanos después de la administración de los anticuerpos ANGPTL4 seleccionados de la invención.

La Figura 4 representa el total de las concentraciones en plasma de anticuerpos humanos en, macacos diabéticos obesos tras la administración de un anticuerpo ANGPTL4 de la invención (NEG276-LALA).

La Figura 5 representa los cambios en las concentraciones en plasma de triglicéridos (TG), en monos cynomolgus diabéticos obesos tras la administración de un anticuerpo ANGPTL4 de la invención (NEG276-LALA).

La Figura 6 representa los cambios en la concentración total de colesterol en plasma, de monos cynomolgus diabéticos obesos tras la administración de un anticuerpo ANGPTL4 de la invención (NEG276-LALA).

LA Figura 7 representa los cambios las concentraciones de la lipoproteína de alta densidad (HDL)el plasma, en monos cynomolgus diabéticos obesos tras la administración de un anticuerpo ANGPTL4 de la invención (NEG276-LALA).

La Figura 8 representa los cambios en las concentraciones totales en plasma de la apolipoproteína B (ApoB), en monos cynomolgus diabéticos obesos tras la administración de un anticuerpo ANGPTL4 de la invención (NEG276-LALA).

La Figura 9 representa los cambios en las concentraciones totales en plasma de apolipoproteínas C-III (APOC-III), de monos cynomolgus diabéticos obesos tras la administración de un anticuerpo ANGPTL4 de la invención (NEG276-LALA).

La Figura 10 representa los cambios en los niveles de colesterol asociados a la lipoproteína de plasma según la evaluación de por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) de la separación de la lipoproteína de plasma tras la administración de un anticuerpo ANGPTL4 de la invención. Los datos de un mono se muestran (NEG276-LALA, mono # 6296). Abreviaturas: TRL, lipoproteínas ricas en triglicéridos; LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad.

La Figura 11 representa los cambios en los niveles de triglicéridos (TG) asociados a lipoproteína de plasma como se evaluó por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) la separación de la lipoproteína de plasma tras la administración de un anticuerpo ANGPTL4 de la invención. Los datos de un mono se muestran (NEG276-LALA, mono # 6296). Abreviaturas: TRL, lipoproteínas ricas en triglicéridos; LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de moléculas de anticuerpos que se unen específicamente a ANGPTL4 e inhiben sus actividades biológicas. La invención se refiere tanto a los anticuerpos completos de formato IgG (por ejemplo, anticuerpos humanizados NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318, NEG319), así como fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tales como fragmentos Fab.

Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a ANGPTL4 (por ejemplo, ANGPTL4 humana), composiciones farmacéuticas, métodos de producción, y métodos de uso de tales anticuerpos y composiciones.

Proteínas ANGPTL4

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a ANGPTL4 e inhiben sus actividades biológicas, incluyendo la capacidad de activar a la lipoproteína lipasa (LPL). Por el contrario,

La protéina similar a angiopoyetina-4 (ANGPTL4) es un miembro de la familia de proteínas secretadas de angiopoyetina. Es una proteína homooligomérica, capaz de formar dímeros y tetrámeros, que se expresa por tipos de células que incluyen macrófagos, células adiposas, musculares y hepáticas. ANGPTL4 también se conoce como proteína hepática relacionada con fibrinógeno/angiopoyetina(HFARP):; (Kim et al (2000) Biochem J. 346 603-610.). proteína relacionada con PPAR gamma angiopoyetina (PGAR) (Yoon et al (2000) Mol Cell Biol., 20: 5.343-5349) y factor adiposos inducido por el ayuno (FIAF) (Kerten et al (2000) J. Biol.. Chem., 275: 28488 a 28493). ANGPTL4 contiene un dominio de espiral N-terminal y un dominio C-terminal similar a fibrinógeno (FBN) (Kim et al (2000) Biochem J. 346: 603-610).

La lipoproteína lipasa (LPL) tiene un papel central en el metabolismo de las lipoproteínas al mantener los niveles normales de lipoproteínas en la sangre y, a través del tejido la regulación específica de su actividad, para determinar cuándo y en qué tejidos los triglicéridos (TG) son descargados. La región espiral de ANGPTL4 es conocida por inhibir a la depuración de triglicéridos (TG) mediada por lipoproteína lipasa (LPL). Por lo tanto, las mutaciones de pérdida de función de ANGPTL4 (por ejemplo, como se ve en los sujetos humanos), deleciones genéticas (por ejemplo, como se ve en ratones transgénicos), y la inhibición de los anticuerpos (por ejemplo, como se ve en ratones y monos cynomolgus) se ha observado que disminuyen los triglicéridos plasmáticos. Además, también se conocen anticuerpos ANGPTL4 que activan LPL. Por el contrario, la inyección de ANGPTL4 en ratones produce un aumento rápido en los triglicéridos circulantes y esto es a una velocidad más alta que

la inyección de proteína-angiopoyetina 3 (ANGPTL3) (Yoshida et al (2002) J Lipid Res. 43: 1770-1772).

Los anticuerpos anti-ANGPTL4 y fragmentos de unión a antígenos descritos en esta invención inician, promueven o potencian la activación de LPL, por ejemplo, mediante el bloqueo de la inhibición de ANGPTL4 de LPL, disminuyendo de ese modo los triglicéridos plasmáticos. Se espera que estos anticuerpos prevengan y alivien las manifestaciones agudas y crónicas de enfermedades caracterizadas por niveles elevados de triglicéridos, por ejemplo, dislipidemia primaria, hipertrigliceridemia, síndrome metabólico, diabetes tipo II, y similares.

Los anticuerpos anti-ANGPTL4 y fragmentos de unión a antígenos descritos en esta invención inician promueven o potencian la activación de la LPL, por ejemplo, mediante el bloqueo de la inhibición de ANGPTL4 de LPL, disminuyendo de ese modo los triglicéridos plasmáticos. Se espera que estos anticuerpos para prevengan y alivien las manifestaciones agudas y crónicas de las enfermedades caracterizadas por niveles elevados de triglicéridos, por ejemplo, dislipidemia primaria, hipertrigliceridemia, síndrome metabólico, diabetes tipo II, y similares.

Anticuerpos ANGPTL4 y fragmentos de unión a antígeno

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a ANGPTL4. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a ANGPTL4 de mono cynomolgus y humanos. Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos humanizados y Fab, aislados como se describe en los Ejemplos.

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína de ANGPTL4 (por ejemplo, ANGPTL4 humana y de mono cynomolgus), en donde los anticuerpos comprenden un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 13, 38, 58, 78, 98, 118, y 138. La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína de ANGPTL4, en donde los anticuerpos comprenden una VH CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las VH CDRs enumerados en la Tabla 1, *infra*. En particular, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína de ANGPTL4 (por ejemplo, ANGPTL4 humana y de mono

cynomolgus), en donde los anticuerpos comprenden (o alternativamente, consisten en) una, dos, tres o más CDRs de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de los CDRs de VH que se enumeran en la Tabla 1, *infra*.

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína de ANGPTL4, dichos anticuerpos comprenden un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 23, 48, 68, 88, 108, 128, y 148. La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína de ANGPTL4 (por ejemplo, ANGPTL4 humana y de mono cynomolgus), dichos anticuerpos que comprende una CDR de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las VL de CDR enumeradas en la Tabla 2, *infra*. En particular, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína de ANGPTL4 (por ejemplo, ANGPTL4 humana y de mono cynomolgus), dichos anticuerpos que comprenden (o alternativamente, que consisten en) una, dos, tres o más CDRs de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDRs de VL enumeradas en la Tabla 1, *infra*.

Otros anticuerpos de la invención incluyen aminoácidos que han sido mutados, sin embargo, tienen al menos 60, 70, 80, 85, 90 o 95 por ciento de identidad en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en las secuencias descritas en la Tabla 1. En algunas modalidades, que incluyen secuencias de aminoácidos mutantes en las que no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido mutadas en las regiones CDR cuando se compara 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 longitud completa de la cadena pesada, y la la longitud completa de la cadena ligera de los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína de ANGPTL4 (por ejemplo, ANGPTL4 humana y de mono cynomolgus). Tales secuencias de ácido nucleico pueden ser optimizadas para la expresión en células de mamífero (por ejemplo, la Tabla 1 muestra las secuencias de ácidos nucleicos optimizadas para la cadena ligera y la cadena pesada de los anticuerpos de la invención).

Tabla 1. Ejemplos de anticuerpos ANGPTL4, Fab y Proteínas ANGPTL4

Descripción de la Secuencia	Identificador de Secuencia (SEQ ID NO.)	Secuencia de aminoácidos o polinucleótidos
Secuencia de aminoácidos de ANGPTL4 humana (NCBI Secuencia de Referencia: NM_139314.2)	1	MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSK SPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERT RSQLSALERRLSACGSACQGTEGSTDLPLAPE SRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQ QRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKHLDHEVAK PARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRLHRLPRDCQ ELFQVGERQSGLFEIQPQGSPPFLVNCKMTSD GGWTVIQRRHDGSVDFNRPWEAYKAGFGDP HGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDG NAELLQFSVHLGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGA TTVPPSGLSVPFSTWDQDHDLRRDKNCAKSL SGGWWFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQKLK KGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEAAS
Secuencia de ácido nucleico de ANGPTL4 humana (NCBI Referencia NM_139314.2)	2	ATGAGCGGTGCTCCGACGGCCGGGGCAGC CCTGATGCTCTGCGCCGCCACCGCCGTGCT ACTGAGCGCTCAGGGCGGACCCGTGCAGTC CAAGTCGCCGCGCTTTGCGTCCTGGGACGA GATGAATGTCCTGGCGCACGGACTCCTGCA GCTCGGCCAGGGGCTGCGCGAACACGCGG AGCGCACCCGCAGTCAGCTGAGCGCGCTG GAGCGGCGCCTGAGCGCGTGCGGGTCCGC CTGTCAGGGAACCGAGGGGTCCACCGACCT CCCGTTAGCCCCTGAGAGCCGGGTGGACCC TGAGGTCCTTCACAGCCTGCAGACACAACT CAAGGCTCAGAACAGCAGGATCCAGCAACT CTTCCACAAGGTGGCCCAGCAGCAGCGGCA CCTGGAGAAGCAGCACCTGCGAATTCAGCA TCTGCAAAGCCAGTTTGGCCTCCTGGACCA CAAGCACCTAGACCATGAGGTGGCCAAGCC TGCCCGAAGAAAGAGGCTGCCCGAGATGGC CCAGCCAGTTGACCCGGCTCACAATGTCAG CCGCCTGCACCGGCTGCCCAGGGATTGCCA

		GGAGCTGTTCCAGGTTGGGGAGAGGCAGA GTGGACTATTTGAAATCCAGCCTCAGGGGT CTCCGCCATTTTTGGTGAACTGCAAGATGAC CTCAGATGGAGGCTGGACAGTAATTCAGAG GCGCCACGATGGCTCAGTGGACTTCAACCG GCCCTGGGAAGCCTACAAGGCGGGGTTTGG GGATCCCCACGGCGAGTTCTGGCTGGGTCT GGAGAAGGTGCATAGCATCACGGGGGACC GCAACAGCCGCCTGGCCGTGCAGCTGCGG GACTGGGATGGCAACGCCGAGTTGCTGCAG TTCTCCGTGCACCTGGGTGGCGAGGACACG GCCTATAGCCTGCAGCTCACTGCACCCGTG GCCGGCCAGCTGGGCGCCACCACCGTCCC ACCCAGCGGCCTCTCCGTACCCTTCTCCAC TTGGGACCAGGATCACGACCTCCGCAGGGA CAAGAACTGCGCCAAGAGCCTCTCTGGAGG CTGGTGGTTTGGCACCTGCAGCCATTCCAA CCTCAACGGCCAGTACTTCCGCTCCATCCC ACAGCAGCGGCAGAAGCTTAAGAAGGGAAT CTTCTGGAAGACCTGGCGGGGCCGCTACTA CCCGCTGCAGGCCACCACCATGTTGATCCA GCCCATGGCAGCAGAGGCAGCCTCCTAGCG TC
ANGPTL4 de Cyno (secuencia de aminoácidos)	3	MRGAPTAGAALMLCVATAVLLRAQGGPVQSK SPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERT RSQLNALERRLSACGSACQGTEGSTALPLAPE SRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQ QRHLEKQHLRIQRLQSQVGLLDPKHLDHEVAK PARRKRRPEMAQPVDSAHNASRLHRLPRDCQ ELFEDGERQSGLFEIQPQGSPPFLVNCKMTSD GGWTVIQRRHDGSVDFNRPWEAYKAGFGDP QGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLQDWDG NAESLQFSVHLGGEDTAYSLQLTEPVASQLGA TTVPPSGLSVPFSTWDQDHDLRRDKNCAKSL SGGWWFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQELK

		KGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPTAAEAAS
ANGPTL4 de Cyno (secuencia de ácido nucleico)	4	ATGCGCGGTGCTCCGACGGCCGGAGCAGC CCTGATGCTCTGCGTCGCCACGGCCGTGCT GCTGAGAGCTCAGGGCGGCCCGGTGCAGT CCAAGTCTCCGCGCTTTGCGTCCTGGGACG AGATGAATGTCCTGGCGCACGGACTCCTGC AGCTAGGCCAGGGGCTGCGCGAACACGCG GAGCGCACCCGCAGTCAGCTGAACGCGCTG GAGCGGCGCCTCAGCGCTTGCGGGTCTGC CTGCCAGGGAACCGAGGGGTCCACCGCCC TCCCGTTAGCCCCTGAGAGCCGGGTGGACC CTGAGGTCCTTCACAGCCTGCAGACACAAC TCAAGGCTCAGAACAGCAGGATCCAGCAAC TCTTCCACAAGGTGGCCCAGCAGCAGCGGC ACCTGGAGAAGCAGCACCTGCGAATTCAGC GTCTGCAAAGCCAGGTTGGCCTCCTGGACC CCAAGCACCTAGACCATGAGGTGGCCAAGC CTGCCCGAAGAAAGAGGCGGCCCGAGATG GCCCAGCCAGTTGACTCGGCTCACAATGCC AGCCGCCTGCACCGGCTGCCCAGGGATTGC CAGGAGCTGTTTGAAGATGGGGAGAGGCAG AGTGGACTATTTGAGATCCAGCCTCAGGGG TCTCCGCCATTTTTGGTGAACTGCAAGATGA CCTCAGATGGAGGCTGGACAGTAATTCAGA GGCGCCACGATGGCTCTGTGGACTTCAACC GGCCCTGGGAAGCCTACAAGGCGGGGTTTG GGGATCCCCAAGGCGAGTTCTGGCTGGGCC TGGAGAAGGTGCATAGCATCACAGGGGACC GCAACAGCCGCCTGGCCGTGCAGCTGCAG GACTGGGATGGCAACGCCGAGTCGCTGCAG TTCTCTGTGCACCTGGGTGGCGAGGACACG GCTTACAGCCTGCAGCTCACCGAGCCCGTG GCCAGCCAGTTGGGTGCCACCACCGTCCCG CCTAGCGGCCTCTCCGTACCCTTCTCCACTT GGGACCAGGATCACGACCTCCGCAGGGACA

		AGAACTGCGCCAAGAGCCTCTCTGGAGGCT GGTGGTTTGGCACCTGCAGCCATTCCAACC TCAATGGCCAGTACTTCCGCTCCATCCCACA GCAGCGGCAGGAGCTTAAGAAAGGAATCTT CTGGAAGACCTGGCGGGGCCGCTACTACCC GCTGCAGGCCACCACCATGTTGATCCAGCC CACGGCGGCAGAGGCAGCCTCCTAG
Secuencia de aminoácidos de ANGPTL3 Humana (NCBI Referencia NM_014495.3)	5	MFTIKLLLFIVPLVISSRIDQDNSSFDSLSPEPKS RFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQ INDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRR TTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLLEEKILL QQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLKT FVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQQHSQIKEI ENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLN EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPS NSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNE TWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNY VLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHL VAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNC PEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAK SKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD SESFE
Secuencia de ácido nucleico dee ANGPTL3 Humana (NCBI Referencia NM_014495.3)	6	ATGTTCACAATTAAGCTCCTTCTTTTTATTGT TCCTCTAGTTATTTCCTCCAGAATTGATCAAG ACAATTCATCATTTGATTCTCTATCTCCAGAG CCAAAATCAAGATTTGCTATGTTAGACGATG TAAAAATTTTAGCCAATGGCCTCCTTCAGTT GGGACATGGTCTTAAAGACTTTGTCCATAAG ACGAAGGGCCAAATTAATGACATATTTCAAA AACTCAACATATTTGATCAGTCTTTTTATGAT CTATCGCTGCAAACCAGTGAAATCAAAGAAG AAGAAAAGGAACTGAGAAGAACTACATATAA ACTACAAGTCAAAAATGAAGAGGTAAAGAAT ATGTCACTTGAACTCAACTCAAAACTTGAAA GCCTCCTAGAAGAAAAAATTCTACTTCAACA

		AAAAGTGAAATATTTAGAAGAGCAACTAACT AACTTAATTCAAAATCAACCTGAAACTCCAG AACACCCAGAAGTAACTTCACTTAAAACTTTT GTAGAAAAACAAGATAATAGCATCAAAGACC TTCTCCAGACCGTGGAAGACCAATATAAACA ATTAAACCAACAGCATAGTCAAATAAAAGAA ATAGAAAATCAGCTCAGAAGGACTAGTATTC AAGAACCCACAGAAATTTCTCTATCTTCCAA GCCAAGAGCACCAAGAACTACTCCCTTTCTT CAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATG ATGGCATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTA TAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTAT GCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTC ATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGTAGTCC ATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATGGA TCACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACT ACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGA ATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTCC ATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAAT TGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAACAAACAT TATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCA CGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCG ATTACTGGCAATGTCCCCAATGCAATCCCGG AAAACAAAGATTTGGTGTTTTCTACTTGGGA TCACAAAGCAAAAGGACACTTCAACTGTCCA GAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGGCAT GATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTA AATATAACAAACCAAGAGCAAAATCTAAGCC AGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAGTC TCAAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAA CCAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTCAGA AAGCTTTGAA
NEG276		
HCDR1 (Kabat)	7	SSWMQ
HCDR2 (Kabat)	8	EIDPSDNYANYNQKFQG

HCDR3 (Kabat)	9	GSYFSNFFDY
HCDR1 (Chothia)	10	AYTFTSS
HCDR2 (Chothia)	11	DPSDNY
HCDR3 (Chothia)	12	GSYFSNFFDY
VH	13	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASAYTFTS SWMQWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDNYANY NQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCASGSYFSNFFDYWGQGTLVTVSS
ADN que codifica VH	14	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGCCTACACCTTTACC AGCAGCTGGATGCAGTGGGTGCGCCAGGCT CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGA GATCGACCCCAGCGACAACTACGCCAACTA CAACCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCT GACCGTGGACACCAGCACCTCCACCGCCTA CATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGA CACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGCGGCAG CTACTTCAGCAACTTCTTCGACTACTGGGGC CAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCATCT
Cadena Pesada	15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASAYTFTS SWMQWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDNYANY NQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCASGSYFSNFFDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

ADN que codifica la cadena pesada	16	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGCCTACACCTTTACC AGCAGCTGGATGCAGTGGGTGCGCCAGGCT CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGA GATCGACCCCAGCGACAACTACGCCAACTA CAACCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCT GACCGTGGACACCAGCACCTCCACCGCCTA CATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGA CACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGCGGCAG CTACTTCAGCAACTTCTTCGACTACTGGGGC CAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCATCTGCT AGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTG GCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG CACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGA CTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTG GAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGT GCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCC CTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGAC CCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCG AGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAAC AGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCC CTGCCAGCCCCCATCGAAAAGACCATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCA

		GGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG TCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGC CCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAG TGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT ACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCA AG
LCDR1 (Kabat)	17	KASQDIGSNLN
LCDR2 (Kabat)	18	AVSNRGP
LCDR3 (Kabat)	19	LQYASSPWT
LCDR1 (Chothia)	20	SQDIGSN
LCDR2 (Chothia)	21	AVS
LCDR3 (Chothia)	32	YASSPW
VL	23	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDIGSNL NWLQQKPGQAPRRLIYAVSNRGPGIPARFSG SRSGSEYTLTISSLQSEDFAVYYCLQYASSPW TFGQGTKVEIK
ADN que codifica VL	24	GAGATCGTGATGACACAGAGCCCCGCCACC CTGTCCGTGTCTCCAGGCGAAAGAGCCACC CTGAGCTGCAAAGCCAGCCAGGACATCGGC AGCAACCTGAACTGGCTGCAGCAGAAACCA GGCCAGGCCCCCAGAAGGCTGATCTACGCT GTTTCCAACCGTGGTCCTGGCATCCCCGCC AGATTTTCCGGCAGCAGATCCGGCAGCGAG TACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGAGC GAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCTGCAG TACGCCAGCAGCCCCTGGACATTTGGCCAG GGCACCAAGGTGGAAATCAAG
Cadena Ligera	25	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDIGSNL NWLQQKPGQAPRRLIYAVSNRGPGIPARFSG SRSGSEYTLTISSLQSEDFAVYYCLQYASSPW

		TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ADN que codifica la cadena ligera	26	GAGATCGTGATGACACAGAGCCCCGCCACC CTGTCCGTGTCTCCAGGCGAAAGAGCCACC CTGAGCTGCAAAGCCAGCCAGGACATCGGC AGCAACCTGAACTGGCTGCAGCAGAAACCA GGCCAGGCCCCCAGAAGGCTGATCTACGCT GTTTCCAACCGTGGTCCTGGCATCCCCGCC AGATTTTCCGGCAGCAGATCCGGCAGCGAG TACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGAGC GAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCTGCAG TACGCCAGCAGCCCCTGGACATTTGGCCAG GGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTG GCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCC AGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGC CAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTA CCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGG TGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCC AGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAG GACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTG ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT AAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGC
NEG276-LALA		
HCDR1 (Kabat)	7	SSWMQ
HCDR2 (Kabat)	8	EIDPSDNYANYNQKFQG
HCDR3 (Kabat)	9	GSYFSNFFDY
HCDR1 (Chothia)	10	AYTFTSS
HCDR2 (Chothia)	11	DPSDNY
HCDR3 (Chothia)	12	GSYFSNFFDY
VH	13	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASAYTFTS SWMQWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDNYANY

		NQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCASGSYFSNFFDYWGQGTLVTVSS
ADN que codifica VH	27	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAA GTGAAGAAACCCGGCGCTAGTGTGAAAGTC AGCTGTAAAGCTAGTGCCTACACCTTCACCT CTAGCTGGATGCAGTGGGTCAGACAGGCCC CAGGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGAG ATCGACCCTAGCGATAACTACGCTAACTATA ATCAGAAGTTTCAGGGTAGAGTCACCCTGAC CGTGGACACTAGCACTAGCACCGCCTATAT GGAACTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACAC CGCCGTCTACTACTGCGCTAGTGGTAGCTA CTTCTCTAACTTCTTCGACTACTGGGGTCAG GGCACCCTGGTCACCGTGTCTAGC
Cadena Pesada	28	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASAYTFTS SWMQWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDNYANY NQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCASGSYFSNFFDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
ADN que codifica la cadena pesada	29	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAA GTGAAGAAACCCGGCGCTAGTGTGAAAGTC AGCTGTAAAGCTAGTGCCTACACCTTCACCT CTAGCTGGATGCAGTGGGTCAGACAGGCCC CAGGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGAG ATCGACCCTAGCGATAACTACGCTAACTATA

		ATCAGAAGTTTCAGGGTAGAGTCACCCTGAC CGTGGACACTAGCACTAGCACCGCCTATAT GGAACTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACAC CGCCGTCTACTACTGCGCTAGTGGTAGCTA CTTCTCTAACTTCTTCGACTACTGGGGTCAG GGCACCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGC ACTAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACA GCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAACT CTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCT TCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGT ACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACAGTGCCTTC AAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTG CAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAA GGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTG CGACAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGCCC TGCTCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGT GTTCCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACAC CCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGAC CTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGA TCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAG CCTCGGGAGGAACAGTACAACTCCACCTAC CGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCAC CAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAG TGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCC CCTATCGAAAAGACAATCTCCAAGGCCAAG GGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTGTACACC CTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAG GGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAG TGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAAC TACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGA

		CCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGC AACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCC CTGTCCCTGTCTCCCGGCAAG
LCDR1 (Kabat)	17	KASQDIGSNLN
LCDR2 (Kabat)	18	AVSNRGP
LCDR3 (Kabat)	19	LQYASSPWT
LCDR1 (Chothia)	20	SQDIGSN
LCDR2 (Chothia)	21	AVS
LCDR3 (Chothia)	22	YASSPW
VL	23	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDIGSNL NWLQQKPGQAPRRLIYAVSNRGPGIPARFSG SRSGSEYTLTISSLQSEDFAVYYCLQYASSPW TFGQGTKVEIK
ADN que codifica VL	30	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACC CTGAGCGTCAGCCCTGGCGAGCGGGCTACA CTGAGCTGTAAAGCCTCTCAGGATATCGGCT CTAACCTGAACTGGCTGCAGCAGAAGCCCG GTCAGGCCCCTAGACGGCTGATCTACGCCG TGTCTAATAGAGGCCCCGGAATCCCCGCTA GGTTTAGCGGCTCTAGGTCAGGTTCAGAGT ACACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGTCAGA GGACTTCGCCGTCTACTACTGCCTGCAGTA CGCCTCTAGCCCCTGGACCTTCGGTCAGGG CACTAAGGTCGAGATTAAG
Cadena Ligera	25	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDIGSNL NWLQQKPGQAPRRLIYAVSNRGPGIPARFSG SRSGSEYTLTISSLQSEDFAVYYCLQYASSPW TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ADN que codifica la cadena ligera	31	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACC CTGAGCGTCAGCCCTGGCGAGCGGGCTACA CTGAGCTGTAAAGCCTCTCAGGATATCGGCT

		CTAACCTGAACTGGCTGCAGCAGAAGCCCG GTCAGGCCCCTAGACGGCTGATCTACGCCG TGTCTAATAGAGGCCCCGGAATCCCCGCTA GGTTTAGCGGCTCTAGGTCAGGTTCAGAGT ACACCCTGACTATCTCTAGCCTGCAGTCAGA GGACTTCGCCGTCTACTACTGCCTGCAGTA CGCCTCTAGCCCCTGGACCTTCGGTCAGGG CACTAAGGTCGAGATTAAGCGTACGGTGGC CGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAG CGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCA GCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACC CCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG GAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGAC CCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCA ACAGGGGCGAGTGC
NEG278		
HCDR1 (Kabat)	32	SSWMQ
HCDR2 (Kabat)	33	EIDPSDNYANYNQKFQG
HCDR3 (Kabat)	34	GSYFSNFFDY
HCDR1 (Chothia)	35	AYTFTSS
HCDR2 (Chothia)	36	DPSDNY
HCDR3 (Chothia)	37	GSYFSNFFDY
VH	38	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASAYTFTS SWMQWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDNYANY NQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCASGSYFSNFFDYWGQGTLVTVSS
ADN que codifica VH	39	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGCCTACACCTTTACC AGCAGCTGGATGCAGTGGGTGCGCCAGGCT CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGA

		GATCGACCCCAGCGACAACTACGCCAACTA CAACCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCT GACCGTGGACACCAGCACCTCCACCGCCTA CATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGA CACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGCGGCAG CTACTTCAGCAACTTCTTCGACTACTGGGGC CAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCATCT
Cadena Pesada	40	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASAYTFTS SWMQWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDNYANY NQKFQGRVTLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCASGSYFSNFFDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
ADN que codifica la cadena pesada	41	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGCCTACACCTTTACC AGCAGCTGGATGCAGTGGGTGCGCCAGGCT CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGA GATCGACCCCAGCGACAACTACGCCAACTA CAACCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCT GACCGTGGACACCAGCACCTCCACCGCCTA CATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGA CACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGCGGCAG CTACTTCAGCAACTTCTTCGACTACTGGGGC CAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCATCTGCT AGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTG

		GCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG CACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGA CTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTG GAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGT GCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCC CTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGAC CCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCG AGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAAC AGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCC CTGCCAGCCCCCATCGAAAAGACCATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCA GGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG TCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGC CCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAG TGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT ACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCA AG
LCDR1 (Kabat)	42	KASQDIGSNLN
LCDR2 (Kabat)	43	AASVREP

LCDR3 (Kabat)	44	LQYASSPWT
LCDR1 (Chothia)	45	SQDIGSN
LCDR2 (Chothia)	46	AAS
LCDR3 (Chothia)	47	YASSPW
VL	48	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDIGSNL NWLQQKPGQAPRRLIYAASVREPGIPARFSGS RSGSEYTLTISSLQSEDFAVYYCLQYASSPWT FGQGTKVEIK
ADN que codifica VL	49	GAGATCGTGATGACACAGAGCCCCGCCACC CTGTCCGTGTCTCCAGGCGAAAGAGCCACC CTGAGCTGCAAAGCCAGCCAGGACATCGGC AGCAACCTGAACTGGCTGCAGCAGAAACCA GGCCAGGCCCCCAGAAGGCTGATCTACGCT GCTTCCGTCCGTGAGCCTGGCATCCCCGCC AGATTTTCCGGCAGCAGATCCGGCAGCGAG TACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGAGC GAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCTGCAG TACGCCAGCAGCCCCTGGACATTTGGCCAG GGCACCAAGGTGGAAATCAAG
Cadena Ligera	50	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDIGSNL NWLQQKPGQAPRRLIYAASVREPGIPARFSGS RSGSEYTLTISSLQSEDFAVYYCLQYASSPWT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ADN que codifica la cadena ligera	51	GAGATCGTGATGACACAGAGCCCCGCCACC CTGTCCGTGTCTCCAGGCGAAAGAGCCACC CTGAGCTGCAAAGCCAGCCAGGACATCGGC AGCAACCTGAACTGGCTGCAGCAGAAACCA GGCCAGGCCCCCAGAAGGCTGATCTACGCT GCTTCCGTCCGTGAGCCTGGCATCCCCGCC AGATTTTCCGGCAGCAGATCCGGCAGCGAG TACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGAGC GAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCTGCAG

		TACGCCAGCAGCCCCTGGACATTTGGCCAG GGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTG GCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCC AGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGC CAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTA CCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGG TGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCC AGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAG GACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTG ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT AAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGC
NEG310		
HCDR1 (Kabat)	52	SYTMH
HCDR2 (Kabat)	53	YINPSSGYTKYNQKFQG
HCDR3 (Kabat)	54	GWLLLAMDY
HCDR1 (Chothia)	55	GYTFTSY
HCDR2 (Chothia)	56	NPSSGY
HCDR3 (Chothia)	57	GWLLLAMDY
VH	58	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGYTKYN QKFQGRVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAEGWLLLAMDYWGQGTLVTVSS
ADN que codifica VH	59	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACC AGCTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCT CCAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTAC ATCAACCCCAGCAGCGGCTATACCAAGTAC AACCAGAAATTCCAGGGCCGCGTGACCATG ACCGCCGACAAGAGCACAAGCACCGCCTAC ATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGAC ACCGCCGTGTACTATTGTGCCGAGGGCTGG CTGCTGCTGGCCATGGATTATTGGGGCCAG

		GGCACCCTCGTGACCGTGTCTAGT
Cadena Pesada	60	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGYTKYN QKFQGRVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAEGWLLLAMDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
ADN que codifica la cadena pesada	61	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACC AGCTACACCATGCACTGGGTGCGCCAGGCT CCAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTAC ATCAACCCCAGCAGCGGCTATACCAAGTAC AACCAGAAATTCCAGGGCCGCGTGACCATG ACCGCCGACAAGAGCACAAGCACCGCCTAC ATGGAACTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGAC ACCGCCGTGTACTATTGTGCCGAGGGCTGG CTGCTGCTGGCCATGGATTATTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTGTCTAGTGCTAGC ACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCAC AGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTA CTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAA CAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACAC CTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCT GTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCC

		CAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAG CTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTG CCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCT CCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGG ACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG AGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGA CCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCA CCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGC TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAAT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGC CAGCCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTG TACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTG GTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGA GAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCT GGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAG CAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCA GCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCA GAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG
LCDR1 (Kabat)	62	RSSTGAVTTSNYAI
LCDR2 (Kabat)	63	GTNNRAP
LCDR3 (Kabat)	64	ALWYSDHWV
LCDR1 (Chothia)	Sesenta y cinco	STGAVTTSNY
LCDR2 (Chothia)	66	GTN
LCDR3 (Chothia)	67	WYSDHW
VL	68	EAVVTQSPATLSLSPGERATLSCRSSTGAVTT SNYAIWVQEKPGQAPRGLIGGTNNRAPGIPAR FSGSLSGDDATLTISSLQPEDFAVYFCALWYS

		DHWVFGQGTKVEIK
ADN que codifica VL	69	GAAGCCGTCGTGACACAGAGCCCTGCCACC CTGTCACTGAGCCCTGGCGAAAGAGCCACC CTGAGCTGCAGATCTAGCACCGGCGCTGTG ACCACCAGCAACTACGCCATCTGGGTGCAG GAAAAGCCCGGCCAGGCTCCCAGAGGACTG ATCGGCGGCACCAACAATAGAGCCCCTGGC ATCCCCGCCAGATTCAGCGGATCTCTGTCT GGCGACGACGCCACACTGACCATCAGCAGC CTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTGTACTTC TGCGCCCTGTGGTACAGCGACCACTGGGTG TTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
Cadena Ligera	70	EAVVTQSPATLSLSPGERATLSCRSSTGAVTT SNYAIWVQEKPGQAPRGLIGGTNNRAPGIPAR FSGSLSGDDATLTISSLQPEDFAVYFCALWYS DHWVFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ADN que codifica la cadena ligera	71	GAAGCCGTCGTGACACAGAGCCCTGCCACC CTGTCACTGAGCCCTGGCGAAAGAGCCACC CTGAGCTGCAGATCTAGCACCGGCGCTGTG ACCACCAGCAACTACGCCATCTGGGTGCAG GAAAAGCCCGGCCAGGCTCCCAGAGGACTG ATCGGCGGCACCAACAATAGAGCCCCTGGC ATCCCCGCCAGATTCAGCGGATCTCTGTCT GGCGACGACGCCACACTGACCATCAGCAGC CTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTGTACTTC TGCGCCCTGTGGTACAGCGACCACTGGGTG TTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG CGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATC TTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGC GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG

		CAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGA CAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAG CACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGA GAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGAC CCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA GAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
NEG313		
HCDR1 (Kabat)	72	NYWIT
HCDR2 (Kabat)	73	DFYPGGGSTNYNAKLQG
HCDR3 (Kabat)	74	SPPQVAPFDY
HCDR1 (Chothia)	75	GYTFNNY
HCDR2 (Chothia)	76	YPGGGS
HCDR3 (Chothia)	77	SPPQVAPFDY
VH	78	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNN YWITWVRQAPGQGLEWMGDFYPGGGSTNYN AKLQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARSPPQVAPFDYWGQGTLVTVSS
ADN que codifica VH	79	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTAAC AACTACTGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCC CCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCGAC TTCTACCCTGGCGGCGGCAGCACCAACTAC AACGCCAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCTG ACCGTGGACACCAGCACCTCCACCGCCTAC ATGGAACTGCGGAGCCTGAGAAGCGACGAC ACCGCCGTGTATTACTGCGCTAGAAGCCCT CCTCAGGTGGCCCCCTTCGATTATTGGGGC CAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCT
Cadena Pesada	80	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNN YWITWVRQAPGQGLEWMGDFYPGGGSTNYN AKLQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARSPPQVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV

		TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
ADN que codifica la cadena pesada	81	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTAAC AACTACTGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCC CCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCGAC TTCTACCCTGGCGGCGGCAGCACCAACTAC AACGCCAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCTG ACCGTGGACACCAGCACCTCCACCGCCTAC ATGGAACTGCGGAGCCTGAGAAGCGACGAC ACCGCCGTGTATTACTGCGCTAGAAGCCCT CCTCAGGTGGCCCCCTTCGATTATTGGGGC CAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCT AGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTG GCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG CACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGA CTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTG GAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGT GCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCC CTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGAC CCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCG

		AGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAAC AGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCC CTGCCAGCCCCCATCGAAAAGACCATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCA GGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG TCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGC CCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAG TGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT ACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCA AG
LCDR1 (Kabat)	82	QASDYIYHWLG
LCDR2 (Kabat)	83	GASGLET
LCDR3 (Kabat)	84	QQYWSTPWT
LCDR1 (Chothia)	85	SDYIYHW
LCDR2 (Chothia)	86	GAS
LCDR3 (Chothia)	87	YWSTPW
VL	88	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASDYIYHW LGWYQQKPGKAPKLLISGASGLETGVPSRFS GSGSGKDYTFTISSLQPEDIATYYCQQYWSTP WTFGQGTKLEIK
ADN que codifica VL	89	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACC ATCACCTGTCAGGCCAGCGACTACATCTACC ACTGGCTGGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATTAGCGGAG

		CCTCCGGTCTGGAAACCGGCGTGCCAAGCA GATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACT ACACCTTCACCATCAGCTCCCTGCAGCCCG AGGATATCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTA CTGGTCCACCCCCTGGACCTTTGGCCAGGG CACCAAGCTGGAAATCAAG
Cadena Ligera	90	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASDYIYHW LGWYQQKPGKAPKLLISGASGLETGVPSRFS GSGSGKDYTFTISSLQPEDIATYYCQQYWSTP WTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ADN que codifica la cadena ligera	91	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACC ATCACCTGTCAGGCCAGCGACTACATCTACC ACTGGCTGGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATTAGCGGAG CCTCCGGTCTGGAAACCGGCGTGCCAAGCA GATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACT ACACCTTCACCATCAGCTCCCTGCAGCCCG AGGATATCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTA CTGGTCCACCCCCTGGACCTTTGGCCAGGG CACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGC CGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAG CGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCA GCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACC CCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG GAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGAC CCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCA ACAGGGGCGAGTGC

NEG315		
HCDR1 (Kabat)	92	NYWIT
HCDR2 (Kabat)	93	DFYPGGGNTNYNAKLQG
HCDR3 (Kabat)	94	SPPQVAPFDY
HCDR1 (Chothia)	95	GYTFTNY
HCDR2 (Chothia)	96	YPGGGN
HCDR3 (Chothia)	97	SPPQVAPFDY
VH	98	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTN YWITWVRQAPGQGLEWMGDFYPGGGNTNYN AKLQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARSPPQVAPFDYWGQGTLVTVSS
ADN que codifica VH	99	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACC AACTACTGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCC CCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCGAC TTCTACCCTGGCGGCGGCAACACCAACTAC AACGCCAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCTG ACCGTGGACACCAGCACCTCCACCGCCTAC ATGGAACTGCGGAGCCTGAGAAGCGACGAC ACCGCCGTGTATTACTGCGCTAGAAGCCCT CCTCAGGTGGCCCCCTTCGATTATTGGGGC CAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCT
Cadena Pesada	100	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTN YWITWVRQAPGQGLEWMGDFYPGGGNTNYN AKLQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARSPPQVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD

		IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
ADN que codifica la cadena pesada	101	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACC AACTACTGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCC CCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCGAC TTCTACCCTGGCGGCGGCAACACCAACTAC AACGCCAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCTG ACCGTGGACACCAGCACCTCCACCGCCTAC ATGGAACTGCGGAGCCTGAGAAGCGACGAC ACCGCCGTGTATTACTGCGCTAGAAGCCCT CCTCAGGTGGCCCCCTTCGATTATTGGGGC CAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCT AGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTG GCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG CACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGA CTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTG GAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGT GCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCC CTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGAC CCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCG AGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAAC AGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG

		GAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCC CTGCCAGCCCCCATCGAAAAGACCATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCA GGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG TCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGC CCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAG TGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT ACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCA AG
LCDR1 (Kabat)	102	QASEYIYNWLG
LCDR2 (Kabat)	103	GASGLET
LCDR3 (Kabat)	104	QQYWSTPWT
LCDR1 (Chothia)	105	SEYIYNW
LCDR2 (Chothia)	106	GAS
LCDR3 (Chothia)	107	YWSTPW
VL	108	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEYIYNW LGWYQQKPGKAPKLLISGASGLETGVPSRFS GSGSGKDYTFTISSLQPEDIATYYCQQYWSTP WTFGQGTKLEIK
ADN que codifica VL	109	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACC ATCACCTGTCAGGCCAGCGAATACATCTACA ACTGGCTGGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATTAGCGGAG CCTCCGGTCTGGAAACCGGCGTGCCAAGCA GATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACT ACACCTTCACCATCAGCTCCCTGCAGCCCG AGGATATCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTA CTGGTCCACCCCCTGGACCTTTGGCCAGGG CACCAAGCTGGAAATCAAG

Cadena Ligera	110	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEYIYNW LGWYQQKPGKAPKLLISGASGLETGVPSRFS GSGSGKDYTFTISSLQPEDIATYYCQQYWSTP WTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ADN que codifica la cadena ligera	111	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACC ATCACCTGTCAGGCCAGCGAATACATCTACA ACTGGCTGGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATTAGCGGAG CCTCCGGTCTGGAAACCGGCGTGCCAAGCA GATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACT ACACCTTCACCATCAGCTCCCTGCAGCCCG AGGATATCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTA CTGGTCCACCCCCTGGACCTTTGGCCAGGG CACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGC CGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAG CGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCA GCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACC CCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG GAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGAC CCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCA ACAGGGGCGAGTGC
NEG318		
HCDR1 (Kabat)	112	SFWIT
HCDR2 (Kabat)	113	DIYPGGATTNYNEKLQG
HCDR3 (Kabat)	114	SPPQVGPFDY
HCDR1 (Chothia)	115	GYTFTSF
HCDR2 (Chothia)	116	YPGGAT

HCDR3 (Chothia)	117	SPPQVGPFDY
VH	118	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS FWITWVRQAPGQGLEWMGDIYPGGATTNYNE KLQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARSPPQVGPFDYWGQGTLVTVSS
ADN que codifica VH	119	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTATACCTTCACC AGCTTTTGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCC CCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCGAC ATCTACCCTGGCGGCGCCACCACCAACTAC AACGAGAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCTG ACCGTGGACACCAGCACCTCCACCGCCTAC ATGGAACTGCGGAGCCTGAGAAGCGACGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAAGCCCT CCTCAGGTGGGCCCCTTCGATTATTGGGGC CAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCT
Cadena Pesada	120	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS FWITWVRQAPGQGLEWMGDIYPGGATTNYNE KLQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARSPPQVGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
ADN que codifica la cadena pesada	121	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTATACCTTCACC

		AGCTTTTGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCC CCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCGAC ATCTACCCTGGCGGCGCCACCACCAACTAC AACGAGAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCTG ACCGTGGACACCAGCACCTCCACCGCCTAC ATGGAACTGCGGAGCCTGAGAAGCGACGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAAGCCCT CCTCAGGTGGGCCCCTTCGATTATTGGGGC CAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCT AGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTG GCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG CACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGA CTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTG GAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGT GCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCC CTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGAC CCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCG AGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAAC AGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCC CTGCCAGCCCCCATCGAAAAGACCATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCA GGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG TCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACAT

		CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGC CCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAG TGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT ACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCA AG
LCDR1 (Kabat)	122	QASDYIYHWLA
LCDR2 (Kabat)	123	GASSLET
LCDR3 (Kabat)	124	QQYWSIPWT
LCDR1 (Chothia)	125	SDYIYHW
LCDR2 (Chothia)	126	GAS
LCDR3 (Chothia)	127	YWSIPW
VL	128	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASDYIYHW LAWYQQKPGKAPKLLISGASSLETGVPSRFSG SGSGKDYTFTISSLQPEDIATYYCQQYWSIPW TFGQGTKLEIK
ADN que codifica VL	129	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACC ATCACCTGTCAGGCCAGCGACTACATCTACC ACTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATTAGCGGAG CCTCCAGTCTGGAAACCGGCGTGCCAAGCA GATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACT ACACCTTCACCATCAGCTCCCTGCAGCCCG AGGATATCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTA CTGGTCCATCCCCTGGACCTTTGGCCAGGG CACCAAGCTGGAAATCAAG
Cadena Ligera	130	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASDYIYHW LAWYQQKPGKAPKLLISGASSLETGVPSRFSG SGSGKDYTFTISSLQPEDIATYYCQQYWSIPW TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY

		ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ADN que codifica la cadena ligera	131	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACC ATCACCTGTCAGGCCAGCGACTACATCTACC ACTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATTAGCGGAG CCTCCAGTCTGGAAACCGGCGTGCCAAGCA GATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACT ACACCTTCACCATCAGCTCCCTGCAGCCCG AGGATATCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTA CTGGTCCATCCCCTGGACCTTTGGCCAGGG CACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGC CGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAG CGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCA GCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACC CCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG GAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGAC CCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCA ACAGGGGCGAGTGC
NEG319		
HCDR1 (Kabat)	132	SFWIT
HCDR2 (Kabat)	133	DIYPGGANTNYNEKLQG
HCDR3 (Kabat)	134	SPPQVGPFDY
HCDR1 (Chothia)	135	GYTFTSF
HCDR2 (Chothia)	136	YPGGAN
HCDR3 (Chothia)	137	SPPQVGPFDY
VH	138	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS FWITWVRQAPGQGLEWMGDIYPGGANTNYN EKLQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARSPPQVGPFDYWGQGTLVTVSS
ADN que codifica VH	139	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA

		GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTATACCTTCACC AGCTTTTGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCC CCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCGAC ATCTACCCTGGCGGCGCCAACACCAACTAC AACGAGAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCTG ACCGTGGACACCAGCACCTCCACCGCCTAC ATGGAACTGCGGAGCCTGAGAAGCGACGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAAGCCCT CCTCAGGTGGGCCCCTTCGATTATTGGGGC CAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCT
Cadena Pesada	140	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS FWITWVRQAPGQGLEWMGDIYPGGANTNYN EKLQGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARSPPQVGPFDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
ADN que codifica la cadena pesada	141	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAGGCCAGCGGCTATACCTTCACC AGCTTTTGGATCACCTGGGTGCGCCAGGCC CCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCGAC ATCTACCCTGGCGGCGCCAACACCAACTAC AACGAGAAGCTGCAGGGCAGAGTGACCCTG ACCGTGGACACCAGCACCTCCACCGCCTAC ATGGAACTGCGGAGCCTGAGAAGCGACGAC

		ACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAAGCCCT CCTCAGGTGGGCCCCTTCGATTATTGGGGC CAGGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCT AGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTG GCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG CACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGA CTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTG GAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGT GCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCC CTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGAC CCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCG AGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAAC AGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCC CTGCCAGCCCCCATCGAAAAGACCATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCA GGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG TCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGC CCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAG TGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT ACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA

		CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG
LCDR1 (Kabat)	142	QASEYIINWLA
LCDR2 (Kabat)	143	GATGLET
LCDR3 (Kabat)	144	QQYWSIPWT
LCDR1 (Chothia)	145	SEYIINW
LCDR2 (Chothia)	146	GAT
LCDR3 (Chothia)	147	YWSIPW
VL	148	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEYIINWLAWYQQKPGKAPKLLISGATGLETGVPSRFSGSGSGKDYTFTISSLQPEDIATYYCQQYWSIPWTFGQGTKLEIK
ADN que codifica VL	149	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCAGGCCAGCGAATACATCATAAACTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATTAGCGGAGCCACCGGTCTGGAAACCGGCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACTACACCTTCACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACTGGTCCATCCCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAG
Cadena Ligera	150	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEYIINWLAWYQQKPGKAPKLLISGATGLETGVPSRFSGSGSGKDYTFTISSLQPEDIATYYCQQYWSIPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ADN que codifica la cadena ligera	151	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCAGGCCAGCGAATACATCATAAACTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATTAGCGGAG

		CCACCGGTCTGGAAACCGGCGTGCCAAGCA GATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAAGGACT ACACCTTCACCATCAGCTCCCTGCAGCCCG AGGATATCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTA CTGGTCCATCCCCTGGACCTTTGGCCAGGG CACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGC CGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAG CGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCA GCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACC CCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG GAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGAC CCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCA ACAGGGGCGAGTGC

Otros anticuerpos de la invención incluyen aquellos en los que se han mutado los aminoácidos o ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos, sin embargo, tienen al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o 95 por ciento de identidad con las secuencias descritas en la Tabla 1. Algunas modalidades incluyen secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido mutados en las regiones variables cuando se compara con las regiones variables representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1, mientras que conservan sustancialmente la misma actividad de unión a antígeno.

Como cada uno de estos anticuerpos se pueden unir a ANGPTL4, las secuencias de VH, VL, cadena ligera de longitud completa, y cadena pesada de longitud completa (secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos) puede ser "mixtas y emparejadas" para crear otros anticuerpos de unión a ANGPTL4-de la invención. Tales anticuerpos de unión a ANGPTL4-"mixtos y emparejados" pueden ser probados usando los ensayos de unión conocidos en la técnica (por ejemplo, ELISA, y otros ensayos descritos en la

sección de Ejemplos). Cuando estas cadenas están mezcladas y emparejadas, una secuencia de VH de un apareamiento VH/VL particular, debe ser reemplazada con una secuencia VH estructuralmente similar. Del mismo modo una secuencia de longitud completa de la cadena pesada/ longitud completa de la cadena ligera de un apareamiento debe ser reemplazada con longitud completa de la cadena pesada estructuralmente similar. Del mismo modo, una secuencia VL de un apareamiento VH/ VL particular, debe ser reemplazada con una secuencia VL estructuralmente similar. Del mismo modo una secuencia de cadena ligera de longitud completa de un apareamiento longitud completa de la cadena pesada longitud completa de la cadena ligera particular, debe ser sustituido por una secuencia estructuralmente similar de longitud completa de la cadena ligera.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o región de unión a antígeno del mismo que tiene: un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 13, 38, 58, 78, 98, 118, y 138, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 23, 48, 68, 88, 108, 128, y 148, donde el anticuerpo se une específicamente a ANGPTL4 (por ejemplo, ANGPTL4 humana).

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 una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs: 13 y 23; 38 y 48; 58 y 68; 78 y 88; 98 y 108, 118 y 128, o 138 y 148, respectivamente.

En otro aspecto, la invención proporciona (i) un anticuerpo aislado que tiene: una cadena pesada de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha optimizado para la expresión en una célula de mamífero seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 15, 28, 40, 60, 80, 100, 120, y 140, y una cadena ligera de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha optimizado para la expresión en una célula de mamífero seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 25, 50, 70 , 90, 110, 130, y 150; o (ii) una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno de los mismos. 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 cadena ligera que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs: 15 y 25; 28 y 25; 40 y 50; 60 y 70; 80 y 90; 100 y 110; 120 y 130; o 140 y 150, respectivamente.

Los términos "región determinante de complementariedad", y "CDR", como se usan en este documento se refieren a las secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables de los anticuerpos que confieren especificidad de antígeno y afinidad de unión. En general, hay tres CDRs en cada región variable de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres CDR en cada región variable de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada se pueden determinar fácilmente utilizando cualquiera de un número de esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat et al. (1991), " Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (esquema de numeración "Chothia").

Por ejemplo, en Kabat, los residuos de aminoácidos de la CDR de anticuerpo FF1 en el dominio variable de la cadena pesada (VH) se numeran 31-35 (HCDR1), 50-66 (HCDR2) y 99-104 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos de la CDR en el dominio variable de la cadena ligera (VL) se numeran 24-34 (LCDR1), 50-55 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3). Bajo Chothia los aminoácidos de la CDR en la VH se numeran 26-32 (HCDR1), 52-57 (HCDR2) y 99-104 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos en VL están numerados 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2), y 91-96 (LCDR3). Mediante la combinación de las definiciones de CDR de Kabat y Chothia tanto, las CDRs consisten en residuos de aminoácidos 26-35 (hCDR1), 50-66 (HCDR2) y 90-104 (HCDR3) en VH humana y los residuos de aminoácidos 24-34 (LCDR1), 50-55 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en LV humana.

En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos de unión a ANGPTL4 que comprenden las CDR1s, CDR2s, y CDR3s de la cadena pesada y de cadena ligera como se describe en la Tabla 1, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de los CDR1s de VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 7, 32, 52, 72, 92, 112, y 132. Las secuencias de aminoácidos de los CDR2s de VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 8, 33, 53, 73, 93, 113, y 133. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s de VH de los anticuerpos se

muestran en las SEQ ID NOs: 9, 34, 54, 74, 94, 114, y 134. Las secuencias de aminoácidos de los CDR1s de VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 17, 42, 62, 82, 102, 122, y 142. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s de VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs : 18, 43, 63, 83, 103, 123, y 143. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s de VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 19, 44, 64, 84, 104, 124, y 144. Estos regiones CDR están delineadas usando el sistema de Kabat.

Alternativamente, tal como se define mediante el sistema de Chothia (. Al-Lazikani et al, (1997) JMB 273,927-948), las secuencias de aminoácidos de las CDR1s de la VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 10, 35, 55, 75 , 95, 115, y 135. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s de la VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 11, 36, 56, 76, 96, 116, y 136. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 12, 37, 57, 77, 97, 117, 117, y 137. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1s de VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 20, 45, 65 , 85, 105, 125, y 145. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s de la VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 21, 46, 66, 86, 106, 126, y 146. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s de VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NOs: 22, 47, 67, 87, 107, 127, y 147.

Teniendo en cuenta que cada uno de estos anticuerpos pueden unirse a ANGPTL4 y que la especificidad de unión al antígeno se proporciona principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de VH y las secuencias de las CDR1, 2 y 3 de VL se pueden "mezclar y combinar "(es decir, las CDRs de diferentes anticuerpos pueden ser mezcladas y emparejadas, aunque cada anticuerpo contiene preferiblemente una CDR1, 2 y 3 de VH y un CDR1, 2 y 3 de VL para crear otras moléculas de la invención que se unen de ANGPTL4. Tales anticuerpos de unión a ANGPTL4 "mixtos y emparejados" se pueden probar usando los ensayos de unión conocidos en la técnica y los descritos en los ejemplos (por ejemplo, ELISA, SET, Biacore). Cuando las secuencias CDR de VH están mezcladas y emparejadas, la secuencia de una CDR1, CDR2 y/o CDR3 en particular, la secuencia de VH debe ser reemplazada con una(s) secuencia(s) de CDR estructuralmente similar(es). Del mismo modo, cuando las secuencias de la CDR de VL están mezcladas y emparejadas, las secuencias de las CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia particular de VL, debe ser reemplazado con una(s) secuencia(s) de CDR

estructuralmente similar(es). Será fácilmente evidente para el experto en la materia que se pueden crear nuevas secuencias de VH y VL crear mediante la sustitución de uno o más secuencias de CDR de la VH y/o VL con secuencias estructuralmente similares de las secuencias de CDR mostradas en este documento para los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Además de lo anterior, en una modalidad, los fragmentos de unión a antígeno o los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden comprender una CDR1, 2, y 3 de VH, o una CDR 1, 2, y 3 de VL en el que el fragmento se une a ANGPTL4 como un solo dominio variable.

En ciertas modalidades de la invención, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden tener las secuencias de cadena pesada y ligera de los anticuerpos humanizados descritos en la Tabla 1. Más específicamente, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden tener la secuencia pesada y ligera de NEG276 , NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318 y NEG319.

En otras modalidades de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a ANGPTL4 comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada, comprende una región variable CDR2 de la cadena pesada, comprende una región variable CDR3 de la cadena pesada, comprende una región variable CDR1 de la cadena ligera, una región variable CDR2 de la cadena ligera, y una región variable CDR3 de la cadena ligera como se define por Kabat y se describe en la Tabla 1. En todavía otras realizaciones de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente en ANGPTL4 comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada, una región variable CDR2 de la cadena pesada, una región variable CDR3 de la cadena pesada, una región variable CDR1 de la cadena ligera, una región variable CDR2 de la cadena ligera, y una región variable CDR3 de la cadena ligera como se define por Chothia y se describe en la Tabla 1.

En una modalidad específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a ANGPTL4 que comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 7; una región variable CDR2 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 8; una región variable CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 9; una una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 17; una región

variable CDR2 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 18; y una una región variable CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 19.

En otra modalidad específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a ANGPTL4 que comprende un una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 32; una región variable CDR2 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 33; una región variable CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 34; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 42; una región variable CDR2 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 43; y una región variable CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 44.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a ANGPTL4 que comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 52; una región variable CDR2 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 53; una región variable CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 54; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 62; una región variable CDR2 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 63; y una región variable CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 64.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a ANGPTL4 que comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 72; una región variable CDR2 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 73; una región variable CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 74; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 82; una región variable CDR2 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 83; y una región variable CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 84.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a ANGPTL4 que comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 92; una región variable CDR2 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 93; una región variable CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 94; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 102; una región variable CDR2 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 103; y una región variable CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 104.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a ANGPTL4 que comprende u una región variable CDR1 de la

cadena pesada de la SEC ID NO: 112; una región variable CDR2 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 113; una región variable CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 114; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 122; una región variable CDR2 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 123; y una región variable CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 124.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a ANGPTL4 que comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 132; una región variable CDR2 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 133; una región variable CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 134; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 142; una región variable CDR2 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 143; y una región variable CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 144.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a ANGPTL4 que comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 10; una región variable CDR2 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 11; una región variable CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 12; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 20; una región variable CDR2 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 21; y una región variable CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 22.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a ANGPTL4 que comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 35; una una región variable CDR2 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 36; una región variable CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 37; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 45; una región variable CDR2 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 46; y una región variable CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 47.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a ANGPTL4 que comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 55; una región variable CDR2 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 56; una región variable CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 57; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 65; una región variable CDR2 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 66; y una región variable CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 67.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a ANGPTL4 que comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 75; una región variable CDR2 de la cadena pesada de CDR2 de la SEC ID NO: 76; una región variable CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 77; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 85; una región variable CDR2 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 86; y una región variable CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 87.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a ANGPTL4 que comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 95; una región variable CDR2 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 96; una región variable CDR2 de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 97; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 105; una región variable CDR2 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 106; y una región variable CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 107.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a ANGPTL4 que comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 115; una región variable CDR2 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 116; una región variable CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 117; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 125; una región variable CDR2 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 126; y una región variable CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 127.

En otra realización específica, la invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a ANGPTL4 que comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 135; una región variable CDR2 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 136; una región variable CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 137; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 145; una región variable CDR2 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 146; y una región variable CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 147.

En ciertas realizaciones, la invención incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a ANGPTL4 como se describe en la Tabla 1. En una modalidad preferida, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, que se une ANGPTL4 es NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG313, NEG315, NEG318, NEG319.

Anticuerpos homólogos

En aún otra modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno 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 de ANGPTL4 (por ejemplo, ANGPTL4 de humano y de mono cynomolgus), y conserva las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos descritos en la Tabla 1.

Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento funcional de unión a antígeno del mismo, que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en el que 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 del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 13, 38, 58, 78, 98, 118, y 138; el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 23, 23, 48, 68 , 88, 108, 128, 148; y el anticuerpo se une específicamente a ANGPTL4 (por ejemplo, ANGPTL4 humana o de mono cynomolgus). En ciertos aspectos de la invención, las secuencias de la cadena pesada y ligera comprenden además las secuencias de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se define por Kabat, por ejemplo las SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 17, 18, y 19 , respectivamente. En otros ciertos aspectos de la invención, las secuencias de cadena pesada y ligera comprenden además las secuencias de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se define por Chothia, por ejemplo las SEQ ID NOs: 10, 11, 12, 20, 21, y 22, respectivamente.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de 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, l las secuencias de aminoácidos de 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 tienen alta identidad (es decir, 80% o más) con las regiones VH y VL de los descritos en la Tabla 1 se puede obtener por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido

nucleico que codifican las SEQ ID NOs: 13, 38, 58, 78, 98, 118, 118, o 138 y las SEQ ID NOs: 23, 48, 68, 88, 108, 128, o 148, respectivamente, seguidos por la prueba de función retenida del anticuerpo alterado codificado, usando los ensayos funcionales descritos en este documento.

En otras modalidades, las secuencias de aminoácidos de la totalidad de la cadena pesada/cadena ligera pueden ser 50% 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99 % idénticas a las secuencias expuestas en la Tabla 1. Un anticuerpo que tiene la totalidad de la cadena pesada/cadena ligera que tiene alta identidad (es decir, 80% o más) con las cadenas pesadas de longitud completa de cualquiera de las SEQ ID NOs : 15, 28, 40, 60, 80, 100, 120, 133, o 140, y con las cadenas ligeras de longitud completa de cualquiera de las SEQ ID NOs: 25, 25, 50, 70, 90, 110, 130, o 150, se puede obtener por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos, seguidos por la prueba de función retenida del anticuerpo alterado codificado, usando los ensayos funcionales descritos en este documento.

En otras modalidades, las secuencias de nucleótidos de la totalidad de la cadena pesada/ligera pueden ser 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 nucleótidos de las regiones variables de cadena pesada/ ligera pueden ser 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias expuestas en la Tabla 1.

Como se usa en este documento, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir,% de identidad es igual al número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los siguientes ejemplos no limitantes.

Adicional o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente invención además pueden ser utilizadas como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar

secuencias relacionadas. Por ejemplo, tales búsquedas se pueden realizar utilizando el programa BLAST (versión 2.0) de Altschul, et al., 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 secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3, en el que una o más de estas secuencias de CDR han especificado secuencias de aminoácidos basadas en los anticuerpos descritos en este documento o modificaciones conservadoras de las mismas, y en el que los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos de unión ANGPTL4-de la invención.

Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, 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 secuencia de aminoácidos de la región variable CDR1 de la pesada cadena se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 7, 32, 52, 72, 92, 112, y 132, y las modificaciones conservativas de las mismas; la secuencia de aminoácidos de la región variable CDR2 de la pesada cadena se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 8, 33, 53, 73, 93, 113, y 133, y modificaciones conservadoras de las mismas; la secuencia de aminoácidos de la región variable CDR3 de la pesada cadena se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 9, 34, 54, 74, 94, 114, y 134, y modificaciones conservadoras de las mismas; la secuencia de aminoácidos de la región variable CDR1 de la pesada ligera se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 17, 42, 62, 82, 102, 122, y 142, y las modificaciones conservativas de las mismas; la secuencia de aminoácidos de la región variable CDR2 de la pesada ligera se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 18, 43, 63, 83, 103, 123, y 143, y las modificaciones conservativas de las mismas; la secuencia de aminoácidos de la región variable CDR3 de la pesada ligera se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 19, 44, 64, 84, 104, 124, y 144, y las modificaciones conservativas de las mismas; y el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo se unen específicamente a ANGPTL4.

En otras modalidades, el anticuerpo de la invención se optimiza para la expresión en una célula de mamífero tiene una secuencia de longitud completa de la cadena pesada y una secuencia de longitud completa de la cadena ligera, en el que una o más de estas secuencias han especificado secuencias de aminoácidos sobre la base de los anticuerpos descritos en el presente documento o modificaciones conservadoras de las mismas, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos de unión a ANGPTL4 de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo aislado optimizado para la expresión en una célula de mamífero que consta de una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa en el que la cadena pesada de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de las SEQ ID NOs: 15 , 28, 40, 60, 80, 100, 120, y 140, y las modificaciones conservativas de las mismas; y la cadena ligera de longitud completa tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de las SEQ ID NOs: 25, 50, 70, 90, 110, 130, y 150, y las modificaciones conservativas de las mismas; y el anticuerpo se une específicamente a ANGPTL4 (por ejemplo, ANGPTL4 de humano y de mono cynomolgus).

Anticuerpos que se unen al mismo epítope

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítope que los anticuerpos de unión a ANGPTL4 que se describen en la Tabla 1. Los anticuerpos adicionales pueden por lo tanto ser identificados en base a su capacidad para competir (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión de, de una manera estadísticamente significativa) con otros anticuerpos de la invención en ensayos de unión a ANGPTL4 (tales como los descritos en los Ejemplos). La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de los anticuerpos de la presente invención a una proteína ANGPTL4 demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con el anticuerpo por la unión a ANGPTL4; un anticuerpo de este tipo puede, según la teoría no limitante, unirse la mismo eítope o a uno relacionado (por ejemplo, una estructura similar o espacialmente proximal) en la proteína de ANGPTL4 como el anticuerpo con el cual compite. En cierta modalidad, el anticuerpo que se une al mismo epítope en ANGPTL4 como los anticuerpos de la presente invención es un anticuerpo humanizado. Tales anticuerpos humanizados pueden ser preparados y aislados como se describe aquí. Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo "compite" por la unión cuando el anticuerpo competidor inhibe la unión a

ANGPTL4 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 del anticuerpo de competencia.

En otras modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención se unen a uno o más epítopas de ANGPTL4. En algunas modalidades, los epítopes a los que los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se unen son eptiopes lineales. En otras realizaciones, los epítopes a los que los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se unen son eptiopes conformacionales, no lineales.

Anticuerpos diseñados y modificados

Un anticuerpo de la invención además se puede preparar usando un anticuerpo que tiene una o más secuencias de la VH y/o de VL como se muestra en el presente documento como material de partida para diseñar un anticuerpo modificado, que tiene la sropiedades alteradas de un anticuerpo a partir de un anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética 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 del marco. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse mediante la modificación de residuos dentro de la región(es) constante(s), por ejemplo para alterar la función(es) efectora(s) del anticuerpo.

Un tipo de modificación de la región variable que puede realizarse es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de los residuos de aminoácidos que se encuentran en las regiones determinantes de complementariedad de las seis (CDR) de la cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de las CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos de origen natural específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo específico de origen natural injertado en las secuencias marco de un anticuerpo diferente con

propiedades diferentes (ver, por ejemplo, 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, EE.UU. 86: 10029-10.033; Patente de Estados Unidos número 5.225.539 to Winter, y las patentes USNo 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 a la reina y otros)

Por consiguiente, otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 7, 32, 52, 72, 92, 112 y 132; Secuencias de CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 8, 33, 53, 73, 93, 113, y 133; Secuencias CDR3 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 9, 34, 54, 74, 94, 114, y 134, respectivamente; y una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 17, 42, 62, 82, 102, 122, y 142; Secuencias de CDR2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 18, 43, 63, 83, 103, 123, y 143; y las secuencias CDR3 consistes en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19, 44, 64, 84, 104, 124, y 144, respectivamente. Por lo tanto, dichos anticuerpos que contienen las secuencias de anticuerpos monoclonales CDR VH y VL, pueden contener diferentes secuencias del marco de estos anticuerpos.

Tales secuencias del marco pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas de ADN o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de la línea germinal de los anticuerpos. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal de los genes de la región variable de cadena pesada y ligera humanas se pueden encontrar en la base de datos "VBase" de la secuencia de la línea germinal humana (disponible en el World Wide Web en mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, EA, 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; los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan expresamente en el presente documento como referencia.

Un ejemplo de secuencias de marco para su uso en los anticuerpos de la invención son aquellos que son estructuralmente similares a las secuencias de marco utilizadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, secuencias de consenso y/o secuencias de marco utilizado por los anticuerpos monoclonales de la invención. Las secuencias de CDR1, 2 y 3 de VH, y las secuencias CDR1, 2 y 3 de VL, pueden ser injertadas en regiones del marco que tienen una secuencia idéntica como la que se encuentra en el gen de la inmunoglobulina de la línea germinal de la que se deriva la secuencia del marco, o de las secuencias de la CDR que pueden injertarse en regiones estructurales que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos es beneficioso mutar los residuos dentro de las regiones de marco para mantener o mejorar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (véase, por ejemplo, las patentes US nº 5.530.101;. 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 a Queen et al). Los marcos que pueden ser utilizados como andamios sobre los que se pueden construir los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que se describen en este documento que incluyen, pero no se limitan a VH1A, VH1B, VH3, Vk1, VL2, y Vk2. Los marcos adicionales son conocidos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en la base de datos VBASE en la world wide web en vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?&MMN_position=1:1.

Por consiguiente, una realización de la invención se refiere a un anticuerpo aislado anti ANGPTL4, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 13, 38, 58, 78, 98 , 118, y 138, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en la región de marco de tales secuencias, y que comprende además una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 23, 48, 68, 88, 108, 128, y 148, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones de la región marco de tales secuencias.

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar los residuos de aminoácidos dentro de las CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la VH y/o VL para mejorar de ese modo una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés, conocido como "maduración de la afinidad”. La mutagénesis dirigida al sitio o

mutagénesis mediada por PCR se puede realizar para introducir la mutación(es) y el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, se puede evaluar mediante ensayos in vitro o in vivo como se describe en el presente documento y se proporciona en los Ejemplos. Las modificaciones conservativas (como se discutió anteriormente) pueden ser introducidas. Las mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos, adiciones o supresiones. Además, por lo general no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen ANGPTL4-aislados, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que consiste en una región variable de cadena pesada que tiene una región CDR1 de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que tiene SEQ ID NOs: 7, 32, 52, 72, 92, 112, y 132, o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en comparación con la SEC ID NOs: 7, 32, 52, 72, 92, 112, 112, y 132; una región CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 8, 33, 53, 73, 93, 113, y 133, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en comparación con la SEC ID NOs: 8, 33, 53, 73, 93, 113, y 133; una región CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 9, 34, 54, 74, 94, 114, 114, y 134, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en comparación con las SEC ID NOs: 9, 34, 54, 74, 94, 114, y 134; una región CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 17, 42, 62, 82, 102, 122, y 142, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en comparación con la SEC ID NOs: 17, 42, 62, 82, 102, 122, y 142; una región CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 18, 43, 63, 83, 103, 123, y 143, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco amino sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en comparación con la SEC ID NOs: 18, 43, 63, 83, 103, 123, y 143; y una región CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19, 44, 64, 84, 104, 124, y 144, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en comparación con la SEC ID NOs: 19, 44, 64, 84, 104, 124, y 144.

Por consiguiente, en otra modalidad, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen a ANGPTL4, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que consiste en una región variable de cadena pesada que tiene una región CDR1 de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que tiene SEQ ID NOs: 10, 35, 55, 75, 95, 115, y 135 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en comparación con la SEC ID NOs: 10, 35, 55, 75, 95 , 115, y 135; una región CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 11, 36, 56, 76, 96, 116, y 136 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NOs: 11, 36, 56, 76, 96, 116, y 136; una región CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 12, 37, 57, 77, 97, 117, y 137, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco amino sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NOs: 12, 37, 57, 77, 97, 117, y 137; una región CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 20, 45, 65, 85, 105, 125, y 145, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NOs: 20, 45, 65, 85, 105, 125, y 145; una región CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 21, 46, 66, 86, 106, 126, y 146, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NOs: 21, 46, 66, 86, 106, 126, y 146; y una región CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 22, 47, 67, 87, 107, 127, y 147, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NOs: 22, 47, 67, 87, 107, 127, y 147.

Dominios de unión a antígeno injertados en marcos o andamios alternativos

Una amplia variedad de marcos o andamios de anticuerpos/inmunoglobulina pueden ser empleado siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que se une específicamente a ANGPTL4. Tales marcos o andamios

incluyen los 5 idiotipos principales de inmunoglobulinas humanas, o fragmentos de los mismos, e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, que tienen preferiblemente aspectos humanizados. Los anticuerpos de cadena pesada aislada, tales como los identificados en los camélidos son de particular interés en este sentido. Marcos, andamios y fragmentos novedosos continúan siendo descubiertos y desarrollado por los expertos en la técnica.

En un aspecto, la invención se refiere a la generación de anticuerpos no basados en inmunoglobulina utilizando andamios que no son de inmunoglobulina en donde las CDR de la invención se pueden injertar. Se pueden emplear marcos y andamios conocidos o futuros que no sean de inmunoglobulinas, siempre que comprendan una región de unión específica para la proteína blanco ANGPTL4. Marcos o andamios conocidos no inmunoglobulinas incluyen, pero no se limitan a, la fibronectina (Terapéutica compuestas, Inc., Waltham, MA), ankyrin (Partners Molecular AG, Zurich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd., Cambridge, MA y Ablynx nv, Zwijnaarde, Bélgica), lipocalina (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), pequeñas inmuno-farmacéuticos modulares (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxybodies (Avidia, Inc., Mountain View, CA), Proteína A (Affibody AG, Suecia), y AFFILIN (gamma-cristalina o ubiquitina) (Scil Proteínas GmbH, Halle, Alemania).

Los andamios de fibronectina se basan en el dominio de fibronectina tipo III (por ejemplo, el décimo módulo de la fibronectina tipo III (Fn3dominio10)). El dominio de fibronectina tipo III tiene 7 o 8 hebras beta que están distribuidas entre dos láminas beta, que se empacan uno contra otro para formar el núcleo de la proteína, y que contienen además bucles (análogos a CDRs) que conectan las hebras beta entre sí y están expuestos al disolvente. Hay al menos tres de tales bucles en cada borde del sándwich de lámina beta, donde el borde es el límite de la proteína perpendicular a la dirección de las hebras beta (véase el documento US 6.818.418). Estos andamios a base de fibronectina no son una inmunoglobulina, aunque el pliegue global está estrechamente relacionado con el del funcional fragmento más pequeño de anticuerpo, la región variable de la cadena pesada, que comprende toda la unidad de reconocimiento de antígeno en IgG de camello y de llama. Debido a esta estructura, las propiedades de unión a antígenos de los miméticos de anticuerpos que no son inmunoglobulina son similares en naturaleza y afinidad a las de los anticuerpos. Estos andamios se pueden utilizar en un bucle de aleatorización y la estrategia de barajado in vitro que es similar al proceso de maduración de la afinidad de anticuerpos in vivo.

Estas moléculas a base de fibronectina se pueden utilizar como andamios donde las regiones del bucle de la molécula se puede reemplazar con CDR de la invención usando técnicas de clonación estándar.

La tecnología ankyrin se basa en el uso de proteínas derivadas de anquirina con módulos de repetición como andamios para sostener a las regiones variables que pueden ser utilizadas para la unión a diferentes blancos. El módulo de repetición de anquirina es un polipéptido de 33 aminoácidos que consta de dos hélices α antiparalelas y un giro β. La unión de las regiones variables está optimizada principalmente mediante el uso de un ribosoma de expresión.

Los avimeros se derivan de la proteína que contiene un dominio A-natural como LRP-1. Estos dominios son utilizados por la naturaleza de las interacciones proteína-proteína, y más de 250 proteínas humanas se basan estructuralmente de dominios A. Los avimeros consisten en un número de diferentes monómeros " dominio A" (2-10) unidos a través de enlazadores de aminoácidos. Los avimeros que pueden ser creados pueden unirse al antígeno blanco utilizando la metodología descrita en, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nos. 20040175756.; 20050053973; 20050048512; y 20060008844.

Los ligandos de afinidad Afficuerpos son proteínas pequeñas y sencillas que se componen de un paquete de tres hélices 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 de andamio consta de 58 aminoácidos, 13 de los cuales se asignaron al azar para generar bibliotecas de afficuerpos con un gran número de variantes de ligando (Véase, por ejemplo, US 5.831.012). Las moléculas de afficuerpo imitan a los anticuerpos, que tienen un peso molecular de 6 kDa, en comparación con el peso molecular de los anticuerpos, que es 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de unión de moléculas del afficierpo es similar a la de un anticuerpo.

Las anticalinas son productos desarrollados por la empresa Pieris Proteolab AG. Se derivan de lipocalinas, un grupo generalizado de proteínas pequeñas y robustas que por lo general están involucrados en el transporte fisiológico o almacenamiento de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Varias lipocalinas naturales se producen en los tejidos humanos o líquidos corporales. La arquitectura de la proteína es una reminiscencia de las 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 de polipéptido con 160 hasta 180 residuos de aminoácidos, siendo sólo marginalmente más grande que un único dominio de inmunoglobulina. El conjunto de cuatro bucles, que constituye el bolsillo de unión, muestra una pronunciada plasticidad estructural y tolera una variedad de cadenas laterales. El sitio de unión por lo tanto puede ser reformado en un proceso patentado para reconocer moléculas blanco prescritas de forma diferente con una gran afinidad y especificidad. Una proteína de la familia lipocalina, la proteína de unión a bilina-(BBP) de Pieris brassicae ha sido utilizada para desarrollar anticalinas mutagenizando el conjunto de cuatro bucles. Un ejemplo de una solicitud de patente que describe anticalinas es en la Publicación PCT No. WO 199916873.

Las moléculas de afilina son pequeñas proteínas no inmunoglobulinas que están diseñadas para tenerafinidades específicas hacia las proteínas y moléculas pequeñas. Se pueden seleccionar moléculas nuevas de afilina muy rápidamente a partir de dos bibliotecas, cada una de las cuales está basada en un andamio diferente derivado de proteína humana. Las moléculas de afilina no muestran ninguna homología estructural con las proteínas de inmunoglobulina. Actualmente, se emplean dos andamios de afilina, uno de los cuales es gamma cristalina, una proteína estructural del lente del ojo humano y la otra es de las "proteínas de la superfamilia de ubiquitina". Ambos andamios humanos son muy pequeños, muestran estabilidad a altas temperaturas y son casi resistentes a los cambios de pH y agentes desnaturalizantes. Esta alta estabilidad es debida principalmente a la estructura de lámina beta ampliada de las proteínas. Ejemplos de proteínas cristalinas gamma derivadas se describen en WO200104144 y ejemplos de proteínas "tipo ubiquitina" están descritos en WO2004106368.

Miméticos de epítopes de proteínas (PEM) son moléculas similares a péptidos cíclicos de tamaño medio, (MW 1-2kDa) imitando estructuras secundarias de beta-horquilla de proteínas, las estructuras secundarias principales implicadas en las interacciones proteína-proteína.

La presente invención proporciona anticuerpos completamente humanos que se unen específicamente a una proteína de ANGPTL4. En comparación con los anticuerpos quiméricos o humanizados, los anticuerpos humanos de unión a

ANGPTL4 de la invención han reducido aún más la antigenicidad cuando se administran a sujetos humanos.

Anticuerpos de camélidos

Las proteínas de anticuerpos obtenidos de los miembros de la familia del camello y dromedarios (*Camelus bactrianus* y *Calelus dromaderius*) incluyendo nuevos miembros mundiales tales como las especies de llamas (*Lama Paccos*, *Lama glama* y *Lama vicugna*) se han caracterizado con respecto al tamaño, complejidad estructural y antigenicidad en sujetos humanos. Ciertos anticuerpos IgG de esta familia de mamíferos tal y como son encontrados en la naturaleza carecen de cadenas ligeras, y por tanto son estructuralmente distintos de la estructura cuaternaria de cuatro cadenas típico que tiene dos pesadas y dos cadenas ligeras, como los de 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 pequeño único dominio variable identificado como VHH se puede conseguir por ingeniería genética para producir una pequeña proteína que tiene una alta afinidad por una diana, lo que resulta en una nueva proteína derivada de un anticuerpo de peso molecular conocido como un "nanocuerpo camélido ". Ver la patente estadounidense número 5.759.808 expedida el 2 de junio de 1998; véase también Stijlemans, B. et al, 2004 J Biol Chem 279:. 1256-1261; Dumoulin, M. et al, 2003 Nature 424:. 783 a 788; Pleschberger, M. et al. 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. et al. 2002 Int J Cancer 89: 456-62; y Lauwereys, M. et al. 1998 EMBO J 17: 3512-3520. Existen bibliotecas de ingeniería de anticuerpos de camélidos y fragmentos de anticuerpos que están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Ablynx, Gante, Bélgica. Al igual que con otros anticuerpos de origen no humano, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de camélido puede ser alterado de forma recombinante para obtener una secuencia que se asemeja más a una secuencia humana, es decir, el nanocuerpo puede ser "humanizado". Así, la baja antigenicidad natural de los anticuerpos de camélidos puede reducirse aún más en seres humanos.

El nanocuerpo camélido tiene un peso molecular de aproximadamente una décima parte de la 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 de camélidos para unirse a sitios antigénicos que son

funcionalmente invisibles a las proteínas de anticuerpo más grandes, es decir, los nanocuerpos de camélidos son útiles como en la medida que los reactivos detectan antígenos que son de otra manera crípticos utilizando técnicas inmunológicas clásicas, y como posibles agentes terapéuticos . Por lo tanto, todavía otra consecuencia de su tamaño pequeño es que un nanocuerpo camélido puede inhibir como resultado de la unión a un sitio específico en una ranura o hendidura estrecha de una proteína diana, y por lo tanto puede servir en una capacidad que se asemeja más a la función de un fármaco clásico de bajo peso molecular que la de un anticuerpo clásico.

El peso molecular bajo y un tamaño compacto resultan aún más en nanocuerpos de camélidos siendo éstos extremadamente termoestables, estables a pH extremo y a la digestión proteolítica, y poco antigénicos. Otra consecuencia es que los nanocuerpos de camélidos se mueven fácilmente desde el sistema circulatorio hacia los tejidos, e incluso cruzar la barrera sangre-cerebro y pueden tratar los trastornos que afectan el tejido nervioso. Los nanocuerpos pueden facilitar aún más el transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Véase la solicitud de patente U. S. 20040161738 publicada el 19 de agosto de 2004. Estas características combinadas con la baja antigenicidad a los seres humanos indican un gran potencial terapéutico. Además, estas moléculas pueden expresarse plenamente en células procariotas tales como *E. coli* y se expresan como proteínas de fusión con bacteriófagos y son funcionales.

En consecuencia, una característica de la presente invención es un anticuerpo o nanocuerpo camélido que tiene una alta afinidad por ANGPTL4. En ciertas realizaciones en el presente documento, el anticuerpo o nanocuerpo de camélido se produce naturalmente en el animal camélido, es decir, se produce por el camélido después de la inmunización con ANGPTL4 o un fragmento peptídico del mismo, utilizando las técnicas descritas en este documento para otros anticuerpos. Alternativamente, el nanocuerpo camélido de unión a ANGPTL4 está diseñado, es decir, es producido por la selección por ejemplo de una biblioteca de fagos que presentan proteínas nanocuerpo de camélido apropiadamente mutagenizadas usando procedimientos de paneo con ANGPTL4 como un objetivo tal como se describe en los ejemplos en el presente documento. Los nanocuerpos diseñados se puede personalizar aún más mediante la ingeniería genética para tener una vida media en un sujeto receptor de entre 45 minutos y dos semanas. En una realización específica, el anticuerpo de camélido o nanocuerpo se obtiene mediante el injerto de las secuencias

CDR de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos humanos de la invención en las secuencias de marco de un nanocuerpo o un anticuerpo de dominio único, como se describe por ejemplo en el documento PCT / EP93 / 02214.

Moléculas Biespecíficas y Anticuerpos Multivalentes

En otro aspecto, la presente invención se caracteriza por moléculas biespecíficas o multiespecíficas que comprenden un anticuerpo de unión a ANGPTL4, o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o regiones de unión a antígeno del mismo, se puede derivatizar o ligar 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 diferentes sitios de unión o moléculas diana. El anticuerpo de la invención puede de hecho ser derivatizado o ligado a más de una otra 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 están destinados a ser abarcados por el término "molécula biespecífica" como se usa en el presente documento. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede ser unido funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más de otras moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de manera que resulta en una molécula biespecífica.

Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión por ANGPTL4 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítopo diana. Por ejemplo, el segundo epítopo diana es otro epítopo de ANGPTL4 diferente de la primera epítope blanco.

Además, para la invención en donde la molécula biespecífica es multi-específica, la molécula puede incluir además una tercera especificidad de unión, además del primer y segundo epítope blanco.

En una modalidad, 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 un Fv de cadena sencilla . El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o un solo constructo de cadena como se describe en Ladner et al. patente de EE.UU. No. 4.946.778.

Los diacuerpos son moléculas bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, conectadas por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. El par de dominios VH y VL se complementan con los dominios de otra cadena, creando así dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger et al, 1993 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 90: 6.444 hasta 6.448; 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 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 ellos se pueden expresar en forma soluble en bacterias. Los diacuerpos cadena sencilla (SCDB) se producen mediante la conexión de las dos cadenas polipeptídicas de formación de diacuerpo con un 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). Los SCDB pueden expresarse en bacterias en forma monomérica soluble y activa (véase 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 et al, 1996 Protein Eng, 9 (7): 617-21). Un diacuerpo puede fusionarse a Fc para generar un "di-diacuerpo" (véase Lu et al, 2004 J. Biol Chem, 279 (4): 2856-65).

Otros anticuerpos que pueden emplearse en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanos.

Las moléculas biespecíficas se pueden preparar mediante la conjugación de las especificidades de los constituyentes de unión, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y luego conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, una variedad de agentes de acoplamiento o entrecruzamiento pueden ser utilizados para la conjugación covalente. Ejemplos de

agentes de entrecruzamiento incluyen la 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) ciclohaxano-l-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160: 1686; Liu, MA et al, 1985 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 82: 8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78,118-132; Brennan et al, 1985 Science 229: 81-83), y Glennie et al, 1987 J. Immunol.. 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, éstos pueden conjugarse por el enlazamiento sulfhidrilo de las regiones bisagra del C-terminal de las dos cadenas pesadas. En un modo de realización particular, la región bisagra se modifica para contener un número impar de residuos 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 hospedera. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es un mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F (ab') 2 o una proteína de fusión ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena simple que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una sola molécula biespecífica de cadena 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 las patente estadounidenses número 5.260.203; Patente U.S. número 5.455.030; Patente U.S. número 4.881.175; Patente U.S. número 5.132.405; Patente U.S. número 5.091.513; Patente U.S. número 5.476.786; Patente U.S. número 5.013.653; Patente U.S. número 5.258.498; y patente U.S. número 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus objetivos específicos se puede confirmar mediante, por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (REA), el análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición de crecimiento), o ensayo de Western Blot. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos proteína-anticuerpo de interés

particular empleando un reactivo marcado (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 antígeno idénticos o diferentes de los anticuerpos de la unión a ANGPTL4 de la invención. Las porciones de unión al antígeno pueden ser unidos entre sí a través de la fusión de proteínas o enlaces covalentes o no covalentes. Alternativamente, los métodos de ligamiento se han descrito para las moléculas biespecíficas. Los compuestos tetravalentes se pueden obtener por ejemplo por medio del entrecruzamiento 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 Fc o la región bisagra.

Los dominios de trimerización se describen por ejemplo en la patente EP 1 Boreal 012 280B1. Los módulos pentamerizantes se describen por ejemplo en el documento PCT/EP97/05897.

Anticuerpos con vida media extendida

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a la proteína de ANGPTL4 que tienen una vida media prolongada *in vivo*.

Muchos factores pueden afectar la vida media *in vivo* de una proteína. Como ejemplos, filtración renal, el metabolismo en el hígado, la degradación por enzimas proteolíticas (proteasas), y las respuestas inmunogénicas (por ejemplo, proteína de la neutralización por anticuerpos y la captación por los macrófagos y células dendríticas). Una variedad de estrategias pueden ser utilizadas para extender la vida media de los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, por unión química a polietilenglicol (PEG), PEG reCODE, andamio de anticuerpo, ácido polisiálico (PSA), hidroxietil almidón (HES), ligandos de unión a albúmina, y escudos de carbohidratos; por fusión genética a proteínas de unión a las proteínas séricas, tales como albúmina, IgG, FcRn, y la transferencia; por acoplamiento (genéticamente o químicamente) a otros restos de unión que se unen a las proteínas séricas, tales como nanocuerpos, Fabs, DARPins, avímeros, aficuerpos, y anticalinas; por fusión genética a RPEG, albúmina, el dominio

de la albúmina, proteínas de unión a la albúmina, y Fc; o por incorporación en nanotransportadores, formulaciones de liberación lenta, o dispositivos médicos.

Para prolongar la circulación en suero de anticuerpos *in vivo*, se pueden unir moléculas de polímeros inertes, tales como PEG de alto peso molecular a los anticuerpos o un fragmento del mismo con o sin un enlazador multifuncional, ya sea a través de conjugación específica de sitio del PEG al extremo N o C -terminal de los anticuerpos o a través de grupos épsilon-amino presentes en los residuos de lisina. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento de la misma, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster o aldehído derivado reactivo de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se adhieren al anticuerpo o fragmento de anticuerpo . La pegilación puede llevarse a cabo por una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Tal como se utiliza aquí, 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 utilizará derivatización polímero lineal o ramificado que resulta en una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se puede monitorear de cerca por SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación apropiada de moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG sin reaccionar se puede separar de los conjugados anticuerpo-PEG por exclusión por tamaño o por cromatografía de intercambio iónico. Los anticuerpos derivados de PEG pueden ser probados para la actividad de unión, así como para la eficacia *in vivo* utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, por los inmunoensayos descritos en este documento. Los métodos pegilar lasproteínas de se conocen en la técnica y pueden ser aplicados a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, EP 0 154 316 por Nishimura et al. y EP 0 401 384 por Ishikawa et al.

Otras tecnologías modificadas de pegilación incluyen la tecnología de ingeniería de reconstitución químicamente ortogonal (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 proteínas biosintéticas en *E. coli*, levaduras y células de mamífero. El ARNt incorpora un aminoácido no nativo en

cualquier lugar donde está posicionado un codón ámbar, que convierte el ámbar de un codón de parada a uno que señaliza la incorporación del aminoácido químicamente especificado.

La tecnología de la pegilación recombinante (rPEG) también se puede utilizar para la extensión de vida media en suero. Esta tecnología consiste en fusionar genéticamente una cola de proteína no estructurada de 300-600 aminoácidos a una proteína farmacéutica existente. Debido a que el peso molecular aparente de una cadena de proteína no estructurada es de aproximadamente 15 veces más grande que su peso molecular real, la vida media en suero de la proteína se incrementa en gran medida. En contraste con la PEGilación tradicional, que requiere la conjugación química y repurificación, el proceso de fabricación es en gran medida simplificada y el producto es homogéneo.

La polisialización es otra tecnología, que utiliza el polímero natural ácido polisiálico (PSA) para prolongar la vida activa y mejorar la estabilidad de los péptidos y proteínas terapéuticas. El PSA es un polímero del ácido siálico (un azúcar). Cuando se utiliza para proteínas y entrega de fármacos proteína 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 reconocida por el sistema inmune. El polímero de PSA se encuentra naturalmente en el cuerpo humano. Fue adoptado por ciertas bacterias que evolucionaron durante millones de años para cubrir sus paredes con él. Estas bacterias polisialiladas naturalmente fueron capaces, en virtud de mimetismo molecular, frustrar el sistema de defensa del cuerpo. El PSA, la última tecnología de sigilo de la naturaleza, se puede producir fácilmente de estas bacterias en grandes cantidades y con características físicas predeterminadas. El PSA bacteriano es completamente no inmunogénico, incluso cuando se acopla a las proteínas, ya que es químicamente idéntica a PSA en el cuerpo humano.

Otra tecnología incluye el uso de derivados de hidroxietil almidón (“HES”) ligados a los anticuerpos. HES es un polímero natural modificado derivado de almidón de maíz ceroso y puede ser metabolizado por las enzimas del cuerpo. Las soluciones de HES se administran generalmente para sustituir el volumen deficiente de sangre y para mejorar las propiedades reológicas de la sangre. La hesilación de un anticuerpo permite la prolongación de la vida media de circulación por el aumento de la estabilidad de la molécula, así como mediante la reducción de aclaramiento renal,

resultando en un aumento de la actividad biológica. Mediante la variación de diferentes parámetros, tales como el peso molecular del HES, se pueden personalizar una amplia gama de conjugados de anticuerpos de HES.

Los anticuerpos que tienen una vida media aumentada in vivo también se pueden generar introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o eliminaciones) en un dominio constante de IgG, o fragmento del mismo de unión a FcRn (preferiblemente un fragmento Fc o dominio bisagra Fc) . Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional No WO 98/23289; Publicación Internacional Nº WO 97/34631; y la Patente U.S. No. 6.277.375.

Además, los anticuerpos se pueden conjugar a la albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano; HSA) con el fin de hacer que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo sea más estable *in vivo* o tener una vida media más larga *in vivo*. Las técnicas son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Nº WO 93/15199, WO 93/15200, y WO 01/77137; y en la patente europea EP 413.622. Además, en el contexto de un anticuerpo biespecífico tal como se describió anteriormente, las especificidades de anticuerpo pueden ser diseñadas de tal manera que un dominio de unión del anticuerpo se une a ANGPTL4 mientras que un segundo dominio de unión del anticuerpo se une a la albúmina sérica, preferiblemente HSA.

Las estrategias para aumentar la vida media son especialmente útiles en nanocuerpos, aglutinantes a base de fibronectina, y otros anticuerpos o proteínas para las que un aumento en la vida media *in vivo* se desea.

Conjugados de anticuerpos

La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a una proteína recombinante ANGPTL4 fusionados o conjugados químicamente (incluyendo tanto conjugaciones covalentes y 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 descrito en el presente documento (por ejemplo, un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, F (ab) 2 fragmento, un dominio VH, una VH CDR, un dominio VL o una CDR VL) y una proteína heteróloga, polipéptido o péptido. Los métodos para fusionar o conjugar las proteínas, polipéptidos o péptidos a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes US No 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, y 5.112.946.; Patente Europea No EP 307434 y EP 367166.; Publicación Internacional Nº WO 96/04388 y WO 91/06570.; Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154: 5590-5600; y Vil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 11337- 11341.

Se pueden generar proteínas adicionales de fusión a través de las técnicas de la barajado de genes, brajado de fragmentos, barajado de xones y/o barajado de codones (denominados colectivamente como "mezcla de ADN"). El método de barajado de ADN puede 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 mayores afinidades y velocidades de disociación inferiores). Véase, en general, las patentes US No 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252, y 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; y Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24 (2): 308- 313 (cada una de estas patentes y publicaciones se incorporan por 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 error, inserción de nucleótidos aleatoria u otros métodos antes de la recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a una proteína ANGPTL4 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, tal como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido 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 son

comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 821-824, por ejemplo, la 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 hemaglutinina ("HA") etiqueta, lo que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson et al, 1984, Cell 37:. 767), y la etiqueta "flag".

En otras modalidades, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos están conjugados con un agente de diagnóstico o detectable. Tales anticuerpos pueden ser útiles para el seguimiento o pronosticar el inicio, desarrollo, progresión y / o gravedad de una enfermedad o trastorno como parte de un procedimiento de ensayo clínico, tal como determinar la eficacia de una terapia en particular. Tal diagnóstico y la detección pueden lograrse mediante el acoplamiento del anticuerpo a las sustancias detectables incluyendo, pero no limitado a, diversas enzimas, tales como, pero no limitado a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero no limitado a, estreptavidinlbiotina 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 limitado a, la luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radiactivos, tales como, pero no limitado a, el yodo (131I, 125I, 123I y 121I,), carbono (14C), azufre (35S), el tritio (3H), indio (115In, 113In, 112In y 111In,), el tecnecio (99Tc), talio (201Ti), galio (68Ga, 67Ga), paladio (103Pd), molibdeno (99Mo), xenón (133Xe), flúor (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 y 117Tin; y metales emisores de positrones usando varias tomografías de emisión de positrones, y los iones no radiactivos metálicos paramagnéticos.

La presente invención abarca además los usos de anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados con un fragmento terapéutico. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse a un fragmento terapéutico tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo, por ejemplo, alfa-emisores. 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 un fragmento terapéutico o fragmento de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Los fragmentos terapéuticos o fragmentos de drogas no se deben interpretarse como limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el fragmento de fármaco 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 de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, α-interferón, β-interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, un agente anti-angiogénico; o, un modificador de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, una linfoquina.

Por otra parte, un anticuerpo puede conjugarse con restos terapéuticos tales como un ion metálico radiactivo, como alfa-emisores como 213Bi o macrocíclicos quelantes útiles para conjugar iones radiometálicos, incluyendo pero no limitado a, 131In, 131LU, 131Y, 131Ho, 131Sm, para los polipéptidos. En ciertas realizaciones, el macrocíclico quelante es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N ', N' ', N' ''- ácido tetraacético (DOTA) que puede ser unido al anticuerpo a través de una molécula enlazadora. Tales moléculas enlazadora son conocidas comúnmente en la técnica y se describen en Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4 (10): 2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10 (4): 553-7; y Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26 (8): 943-50, cada uno incorporado por referencia en su totalidad.

Las técnicas para conjugar fragmentos terapéuticos a anticuerpos son bien conocidos, véase, por ejemplo, Arnón et al., " Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy ", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (Eds.), Pp 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985).; Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson et al. (Eds.), Pp 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987).; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en 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", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (Eds.), Pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., 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, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Métodos de producción de los anticuerpos de la invención

Nucleic Acids que codifica los anticuerpos

La invención proporciona moléculas de ácido nucleico sustancialmente purificadas que codifican polipéptidos que comprenden segmentos o dominios de las cadenas de anticuerpo de unión a ANGPTL4-descritos anteriormente. Algunos de los ácidos nucleicos de la invención comprenden la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada mostrada en las SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118, o 138, y/o la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera se muestra en las SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128, o 148. En una realización específica, las moléculas de ácido nucleico son las identificadas en la Tabla 1. Algunas otras moléculas de ácido nucleico 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 que se identifican en la Tabla 1. Cuando se expresan a partir de vectores de expresión apropiados, los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos son capaces de exhibir la capacidad de unión al antígeno ANGPTL4.

También se proporcionan en la invención polinucleótidos que codifican al menos una región CDR y por lo general todas las tres regiones CDR de la cadena pesada o ligera del anticuerpo de unión a ANGPTL4 descrito anteriormente. Algunos otros polinucleótidos que codifican la totalidad o sustancialmente la totalidad de la secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo de unión a ANGPTL4 descrito anteriormente. Debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácidos nucleicos codificará cada una de las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden codificar tanto una región variable y una región constante del anticuerpo. Algunas de las secuencias de ácido nucleico de la invención comprenden nucleótidos que codifican una secuencia de cadena pesada que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80%, 90%,

o 99%) a la secuencia de la cadena pesada expuesta en las SEQ ID NO: 15, 28, 40, 60, 80, 100, 120, y 140. Algunas otras secuencias de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican la cadena ligera que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80%, 90%, o 99%) a la secuencia de cadena ligera expuesta en las SEQ ID NO: 25, 50, 70, 90, 110, 130, y 150.

Las secuencias de polinucleótidos pueden ser producidos por síntesis de novo de ADN en fase sólida o por mutagénesis por PCR de una secuencia existente (por ejemplo, las secuencias como se describe en los Ejemplos a continuación) que codifican un anticuerpo de unión a ANGPTL4 o su fragmento de unión. La síntesis química directa de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo por métodos conocidos en la técnica, tales como el método del fosfotriéster de Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90; el método del fosfodiéster de Brown et al., Meth. Enzymol. 68: 109, 1979; el método de dietilfosforamidita de Beaucage et al., Tetra. Lett, 22: 1859, 1981; y el método de soporte sólido de la patente US No. 4.458.066. La introducción de mutaciones a una secuencia de polinucleótido por PCR se puede realizar como se describe en, por ejemplo, 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.

También se proporciona en la invención vectores de expresión y células hospederas para producir los anticuerpos de unión a ANGPTL4 descritos anteriormente. Varios vectores de expresión se pueden emplear para expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas del anticuerpo de unión a ANGPTL4 o los fragmentos de unión. Ambos vectores de expresión basados en virus y no virales se pueden utilizar para producir los anticuerpos en una célula hospedera de mamífero. Los 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 et al, Nat Genet. 15: 345, 1997). Por ejemplo, los vectores no virales útiles para la expresión de los polinucleótidos y polipéptidos de mamífero en la unión de ANGPTL4 (por ejemplo, humanos) células incluyen pThioHis A, B y C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B y C, (Invitrogen, San Diego, CA), vectores de MPSV, y otros numerosos vectores conocidos en la técnica para la expresión de otras proteínas. Los vectores virales

útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, vectores basados en SV40, virus del papiloma, virus Epstein Barr HBP, vectores de virus vaccinia y el virus Semliki Forest (SFV). Véase, Brent et al., Supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49: 807, 1995; y Rosenfeld et al, Cell 68:. 143, 1992.

La elección del vector de expresión depende de las células hospederas deseadas en las que el vector se va a expresar. Típicamente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadores) que están unidas operativamente a los polinucleótidos que codifican una cadena del anticuerpo de unión a ANGPTL4 o fragmento. En algunas modalidades, se emplea un promotor inducible para evitar la expresión de secuencias insertadas, excepto bajo condiciones de inducción. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, arabinosa, lacZ, promotor de metalotioneína o un promotor de choque térmico. Los cultivos de organismos transformados se pueden expandir en condiciones no inducentes sin sesgar la población para las secuencias cuyos productos de expresión son mejor tolerados por las células hospederas de codificación. Además de los promotores, otros elementos reguladores también pueden ser necesarios o deseados para la expresión eficaz de una cadena de anticuerpo de unión a ANGPTL4 o un fragmento. Estos elementos incluyen típicamente un codón de iniciación ATG y el sitio de unión al ribosoma adyacente o otras secuencias. Además, la eficiencia de la expresión puede potenciarse por la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (véase, por ejemplo, Scharf et al, Results Probl Cell Differ 20: 125, 1994; y Bittner et al,. Meth. Enzymol, 153: 516, 1987). Por ejemplo, se pueden usar el potenciador de SV40 o promotor de CMV para aumentar la expresión en células hospederas de mamíferos.

Los vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de la secuencia de señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados por secuencias de anticuerpos insertados de unión a ANGPTL4. Más a menudo, las secuencias de anticuerpos insertados de unión a ANGPTL4 están vinculados a una secuencia de señales antes de su inclusión en el vector. Los vectores que se utilizan para recibir las secuencias que codifican los dominios variables deunión a ANGPTL4 de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo a veces también codifican regiones constantes o partes de las mismas. Tales vectores permiten la expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las

regiones constantes lo que conduce a la producción de anticuerpos o fragmentos intactos de los mismos. Típicamente, tales regiones constantes son humanas.

Las células hospederas que albergan y expresan las cadenas de anticuerpo de unión a ANGPTL4 pueden ser procariotas o eucariotas. E. coli es un hospedero procariota útil para la clonación y expresión de los polinucleótidos de la presente invención. Otros hospederos microbianos adecuados para uso incluyen bacilos, tales como Bacillus subtilis, y otras enterobacterias, tales como Salmonella, Serratia, y diversas especies de Pseudomonas. En estos huéspedes procariotas, uno también puede hacer que los vectores de expresión, que típicamente contienen secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos estará presente, 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 sitio de unión al ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción. Otros microbios, tales como levaduras, también se pueden emplear para expresar polipéptidos de unión a ANGPTL4-de la invención. Las células de insecto en combinación con vectores de baculovirus también se pueden utilizar.

En algunas realizaciones preferidas, las células hospederas de mamífero se usan para expresar y producir los polipéptidos de unión a ANGPTL4-de la presente invención. Por ejemplo, pueden ser o bien una línea celular de hibridoma que expresa genes de inmunoglobulina endógenos (por ejemplo, el clon 1D6.C9 de mieloma hibridoma como se describe en los Ejemplos) o una línea celular de mamífero que alberga un vector de expresión exógena (por ejemplo, las células de mieloma SP2/0 que se ejemplifica a continuación). Estos incluyen cualquier célula animal inmortal mortal o normal o anormal normal o humana. Por ejemplo, un número de líneas de células hospederas adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas se han desarrollado incluyendo las líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, células HeLa, líneas celulares de mieloma, células B e hibridomas transformadas. El uso de cultivo celular de tejido de mamífero para expresar polipéptidos se discute en general en, por ejemplo, Winnacker, DE GENES TO CLONES, VCH Publishers, Nueva York, NY, 1987. Los vectores de expresión para células hospederas de mamífero pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de

replicación, un promotor, y un potenciador (véase, por ejemplo, Queen, et al, Immunol Rev. 89:. 49-68, 1986.), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión de ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción. Estos vectores de expresión usualmente contienen promotores derivados de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específicos a un tipo de células, específicos de etapa, y/o modulables o regulables. Los promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, el promotor de metalotioneína, el promotor tardío principal de adenovirus constitutivo, el promotor de MMTV inducible por dexametasona, el promotor SV40, el promotor de MRP polIII, el promotor MPSV constitutivo, el promotor de CMV inducible por tetraciclina (tal como el promotor humano temprano inmediato CMV), el promotor de CMV constitutivo, y combinaciones promotor-potenciador conocidas en la técnica.

Los métodos para introducir los vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo del tipo de celula hospedera. Por ejemplo, la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación pueden utilizarse para otros hospederos celulares. (Véase en general Sambrook, et al., 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 ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, la fusión a la proteína estructural VP22 del virus del herpes (Elliot y O'Hare, Cell 88: 223, 1997), la absorción de agente mejorada de ADN, y la transducción ex vivo. Para largo plazo, la producción de proteínas recombinantes de alto rendimiento, a menudo se desea la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan establemente la unión de cadenas de anticuerpos o fragmentos de unión a ANGPTL4 pueden prepararse utilizando vectores de expresión de la invención que contienen orígenes virales de replicación 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 medios selectivos. 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

de manera estable se pueden proliferar usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo de célula.

Generación de anticuerpos monoclonales de la invención

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) pueden ser producidos por una variedad de técnicas, incluyendo la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein, 1975 Nature 256: 495. Muchas de las técnicas para la producción de anticuerpos monoclonals se pueden emplear, por ejemplo, la la transformación oncogénica o viral de linfocitos B.

Los sistemas de animales para la preparación de hibridomas incluyen los sistemas murinos, de ratas y de conejos. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos de inmunización y técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión se conocen en la técnica. También se conocen las parejas de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

Los anticuerpos quiméricos o humanos de la presente invención se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se describe anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se puede obtener a partir del hibridoma murino de interés y éste puede ser diseñado para contener secuencias no murinas (por ejemplo, humanas) de inmunoglobulina usando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden estar insertadas a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente U.S. No 4.816.567 a Cabilly *et al*.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinos se pueden insertar en un marco humano usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente U.S Nº 5225539 a Winter, y las patentes U.S. No 5.530.101; 5585089; 5693762 y 6180370 de Queen et al.

En una cierta realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos humanos. Tales anticuerpos humanos dirigidos contra ANGPTL4 pueden generarse

usando ratones transgénicos o transcromosónicos que llevan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones se denominan aquí como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en este documento como "ratones de Ig humana."

El HuMAb mouse® (Medarex, Inc.) contiene el miniloci del gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de la cadena pesada (μ y γ) y ligera κ de inmunoglobulinas humanas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan el loci μ y κ de la cadena endógena (véase, por ejemplo , Lonberg, et al, 1994 Nature 368 (6474):. 856-859). Por consiguiente, los ratones muestran una expresión reducida de IgM de ratón o κ, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanas introducidos experimentan un cambio de clase y mutación somática para generar una alta afinidad por la IgGκ humana monoclonal (Lonberg, N. et al., 1994 supra; revisado en Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg, N. y Huszar, D., 1995 Intern Rev. Immunol.13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg. N., 1995 Ann NY Acad Sci 764: 536-546). La preparación y uso de los ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas realizadas por dichos ratones, se describe adicionalmente en Taylor, L. et al, 1992 Nucleic Acids Research. 20: 6287-6295; Chen, J. et al, 1993 International Immunology 5: 647-656;. Tuaillon et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 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; .y Fishwild, D. et al, 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851, los contenidos de todos los cuales se incorporan específicamente por referencia en su totalidad. Véase también, la patente de U.S. No 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 de Lonberg y Kay; La patente de U.S. No. 5.545.807 a Surani et al.; . Publicación PCT Nº WO 99/45962 WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852 y WO 98/24884, todas de Lonberg y Kay; y la Publicación PCT No. WO 01/14424 de Korman et al.

En otra realización, los anticuerpos humanos de la invención se pueden crecer usando un ratón que lleva secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas tal como un ratón que lleva un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Tales ratones, denominados aquí

como "ratones KM", se describen en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida *et al*.

Aún más, los sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden utilizar para generar anticuerpos de unión a ANGPTL4 de la invención. Por ejemplo, se puede utilizar un sistema transgénico alternativo se conoce como el Xenomouse (Abgenix, Inc.). Tales ratones se describen en, por ejemplo, las patentes US No 5.939.598.; 6.075.181; 6.114.598; 6, 150,584 y 6,162,963 de Kucherlapati et al.

Además, los sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden utilizar para generar anticuerpos de unión a ANGPTL4-de la invención. Por ejemplo, se pueden utilizar los ratones que llevan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana, conocidos como "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97: 722-727. Además, las vacas que llevan transcromosomas de cadena pesada y ligera humanos se han descrito en la técnica (Kuroiwa et al, 2002 Nature Biotechnology 20:. 889-894) y se pueden utilizar para generar anticuerpos de unión a ANGPTL4-de la invención.

Los anticuerpos humanos de la invención también se pueden preparar usando métodos de expresión en fagos para el cribado de bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de expresión en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica o descritos en los ejemplos siguientes. Véase, por ejemplo: patentes de U.S. No 5.223.409;. 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner et al.; Patentes U.S. Nos. 5.427.908 y 5.580.717 de Dower et al.; Patentes U.S. Nos. 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty et al .; y las patente U.S. No 5.885.793.; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths et al.

Los anticuerpos humanos de la invención también se pueden preparar utilizando ratones SCID en los que las células inmunes humanas han sido reconstituidas tal que se puede generar una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Tales ratones se describen en, por ejemplo, Patentes U.S Nos. 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson et al.

<u>Diseño del marco o Fc</u>

Los anticuerpos manipulados de la invención incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones en los residuos dentro del marco de VH y / o VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, tales modificaciones en el marco se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en "mutar en sentido contrario" uno o más residuos del marco de la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sido objeto de mutación somática puede contener residuos del marco que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Tales residuos pueden ser identificados mediante la comparación de las secuencias del marco de los anticuerpos frente a las secuencias de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser "mutadas en sentido contrario" a la secuencia de la línea germinal, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio. Tales anticuerpos "mutados en sentido contrario" también están destinados a ser abarcados por la invención.

Otro tipo de modificación del marco implica la mutación de uno o más residuos de la región marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epitopes de células T para reducir así la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se conoce como "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de Patente U.S. No. 20030153043 por Carr *et al*.

En modificaciones adicionales o alternativas realizadas dentro de las regiones marco o CDR, 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, la fijación del complemento, unión al receptor Fc, y / o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención se puede modificar químicamente (por ejemplo, uno o más -residuos químicos pueden unirse al anticuerpo) o ser modificados para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas modalidades se describe con más detalle a continuación. La numeración de residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, aumentado

o disminuido. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente U.Ss No 5.677.425 por Bodmer *et al*. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el montaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región bisagra Fc de un anticuerpo está mutado para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones de aminoácidos se introducen en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra de tal manera que el anticuerpo ha deteriorado la unión de la proteína A Staphylococcyl (SpA) relativa a la unión del dominio Fc-bisagra nativa a SpA. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente U.S 6.165.745 de Ward et al.

En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su vida media biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, una o más de las siguientes mutaciones se pueden introducir: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente U.S No 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 epítope de unión al receptor salvamiento tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG de unión, como se describe en las patentes US No. 5.869.046 y 6.121.022 por Presta et al.

En aún otras realizaciones, la región Fc se altera mediante la sustitución de residuo de al menos un aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras de anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden ser sustituidos con un residuo aminoácido diferente de tal manera que el anticuerpo tiene una afinidad alterada por un ligando efector, pero conserva la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. 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 con más detalle en las Patentes U.S. Nos. 5.624.821 y 5.648.260, ambas por Winter *et al*.

En otra realización, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos con un residuo aminoácido diferente, tal que el anticuerpo ha alterado la unión y / o reducido o abolido citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de C1q. Este enfoque se describe con más detalle en la patente U.S Nos. 6.194.551 por Idusogie *et al*.

En otra realización, uno o más residuos de aminoácidos son alterados para alterar de ese modo la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351 por Bodmer *et al*.

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

En todavía otra realización, la glicosilación de un anticuerpo se modifica. Por ejemplo, un anticuerpo aglicosilado se puede hacer (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el "antígeno". Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr mediante, por ejemplo, la alteración de uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos se pueden hacer que resultan en la eliminación de uno o más sitios en el marco de la región variable de glicosilación para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe con más detalle en la patente U.S Nos. 5.714.350 y 6.350.861 por Co *et al*.

Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede ser hecho tal que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos fucosil o un anticuerpo que tiene estructuras aumentadas GlcNAc que bisectan. Tales patrones de glicosilación alterados han demostrado que aumentan la capacidad ADCC de anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula hospedera con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con la maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células hospederas en las que se expresan los anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con la glicosilación alterada. Por

ejemplo, EP 1176195 por Hang *et al*. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosiltransferasa, tal que los anticuerpos expresados en dicha línea celular exhiben hipofucosilación. La publicación PCT WO 03/035835 por Presta describe una variante de la línea celular CHO, células Lecl3, con capacidad disminuida para fijar fucosa a Asn (297) unida a carbohidratos, que también resultan en la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula hospedera (véase también Shields, RL *et al*, 2002 J. Biol Chem 277: 26733 a 26740). La publicación PCT WO 99/54342 por Umana *et al*. describe líneas celulares modificadas mediante ingeniería genética para expresar glicosiltransferasas que modifican glicoproteínas (por ejemplo, beta (1,4) -N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal forma que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas mediante ingeniería genética aumentaron las estructuras GlcNAc que bisectan, lo que resulta en un aumento de la actividad ADCC de los anticuerpos (ver también Umaña et al, 1999 Nat Biotech 17: 176-180).

Métodos de Modificación de Anticuerpos Alterados

Como se discutió anteriormente, los anticuerpos de unión a ANGPTL4 que tienen secuencias de VH y VL de longitud completa o secuencias de cadena pesada y ligera mostradas en este documento pueden usarse para crear nuevos anticuerpos de unión a ANGPTL4 mediante la modificación de la longitud completa de la cadena pesada y / o secuencias de cadena ligera, VH y / o secuencias de VL, o las región(es) constante(s) unidas al mismo. Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se utilizan las características estructurales de un anticuerpo de unión a ANGPTL4 de la invención para crear anticuerpos de unión ANGPTL4 estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión a humano ANGPTL4 y también la inhibición de una o más propiedades funcionales de ANGPTL4 (por ejemplo, inhibir la unión de ANGPTL4 al receptor ANGPTL4, inhibir la proliferación celular dependiente de ANGPTL4).

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 marco conocidos y/u otros CDRs para crear, de forma recombinante por ingeniería, anticuerpos de la invención adicionales que se unen a ANGPTL4, como se se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen los descritos en la sección anterior. El material de partida para el método de ingeniería es uno o más de

las secuencias VH y / o VL proporcionadas en este documento, o una o más regiones CDR de los mismos. Para crear el anticuerpo modificado por ingeniería, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias VH y / o VL roporcionada en este documento, o una o más regiones CDR de los mismos. Más bien, la información contenida en la(s) secuencia(s) se utiliza(n) como el material de partida para crear una(s) secuencia(s) de "segunda generación" derivada(s) de la(s) secuencia(s) original(es) y luego la(s) secuencia(s) de "segunda generación" se prepara(n) y se expresa(n) como una proteína.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo de unión a ANGPTL4 que consiste en una secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo que tiene una secuencia de CDR1 seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 7, 32, 52, 72, 92 , 112, y 132, una secuencia de CDR2 seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 8, 33, 53, 73, 93, 113, y 133, y/o una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 9, 34, 54, 74, 94, 114 y 134; y una secuencia de región variable de cadena pesada de un anticuerpo que tiene una secuencia CDR1 seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 17, 42, 62, 82, 102, 122, y 142, una secuencia de CDR2 seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 18, 43, 63, 83, 103, 123, y 143, y/o una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19, 44, 64, 84, 104, 124, y 144; alterar al menos un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo y/o la secuencia de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterado; y expresar la secuencia de anticuerpo alterado como una proteína.

Por consiguiente, en otra modalidad, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo de unión a ANGPTL4 que consiste en una secuencia de la región variable de cadena pesada del anticuerpo que tiene una secuencia de CDR1 seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 10, 35, 55, 75, 95 , 115, y 135, una secuencia de CDR2 seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 11, 36, 56, 76, 96, 116, y 136, y/o una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 12, 37, 57, 77, 97, 117 y 137; y una secuencia de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que tiene una secuencia CDR1 seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 20, 45,

65, 85, 105, 125, y 145, una secuencia de CDR2 seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 21, 46, 66, 86, 106, 126, y 146, y/o una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 22, 47, 67, 87, 107, 127, y 147; alterar al menos un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo y/o la secuencia de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterado; y expresar la secuencia de anticuerpo alterado como una proteína.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo optimizado de unión a ANGPTL4 para la expresión en una célula de mamífero que consiste en: una secuencia de longitud completa de la cadena pesada de un anticuerpo que tiene una secuencia seleccionada del grupo de las SEQ ID NOs: 15, 28, 40, 60, 80, 100, 120, y 140; y una secuencia de longitud completa de la cadena ligera del anticuerpo que tiene una secuencia seleccionada del grupo de las SEQ ID NOs: 25, 50, 70, 90, 110, 130, y 150; alterar al menos un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo y/o la secuencia de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterado; y expresar la secuencia de anticuerpo alterado como una proteína. En una realización, la alteración de la cadena pesada o ligera está en la región del marco de la cadena pesada o ligera.

La secuencia del anticuerpo alterado también se puede preparar mediante el cribado de bibliotecas de anticuerpos que tienen secuencias de CDR3 fijas o determinantes de unión mínimos esenciales como se describe en US2005/0255552 y la diversidad en las secuencias CDR1 y CDR2. El cribado se puede realizar de acuerdo con cualquier tecnología de detección apropiado para el cribado de anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos, tales como la tecnología de presentación de fagos.

Se pueden utilizar técnicas de biología molecular estándar para preparar y expresar la secuencia del anticuerpo alterado. El anticuerpo codificado por la(s) secuencia(s) del anticuerpo alterado es uno que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos de unión a ANGPTL4 descritos en este documento, propiedades funcionales que incluyen, pero no se limita a, unirse específicamente a ANGPTL4 de humano, cynomolgus , rata, y/o ratón; e inhibir la

proliferación celular dependiente de ANGPTL4 en un ensayo de proliferación celular F36E y/o Ba/F3-ANGPTL4R.

En ciertas realizaciones de los métodos de diseño de los anticuerpos de la invención, se pueden introducir mutaciones al azar o selectivamente a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia de codificación del anticuerpo de unión a ANGPTL4 y los anticuerpos de unión a ANGPTL4 resultantes modificados que pueden ser examinados para la actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe aquí. Métodos mutacionales se han descrito en la técnica. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 describe por métodos cortos para crear y seleccionar mutaciones de anticuerpos utilizando mutagénesis de saturación, el conjunto sintético de ligadura, o una combinación de los mismos. Alternativamente, la publicación PCT WO 03/074679 por Lazar et al. describe métodos de uso de métodos de cribado computacionales para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención han sido diseñados para eliminar los sitios de desamidación. La desamidación se sabe que causa cambios estructurales y funcionales en un péptido o proteína. La desamidación puede resultar en la disminución de la bioactividad, así como en alteraciones en la farmacocinética y la antigenicidad de la proteína farmacéutica. (Anal Chem 2005 01 de marzo; 77 (5): 1432-9).

En ciertas modalidades de la invención, los anticuerpos han sido diseñados para aumentar pI e incrementar sus propiedades similares fármacos. El pI de una proteína es un factor determinante de las propiedades biofísicas generales de una molécula. Los anticuerpos que tienen pIs bajos han sido conocidos por ser menos solubles, menos estables, y propensos a la agregación. Además, la purificación de los anticuerpos con bajo pI es difícil y puede ser problemática, especialmente durante la ampliación para uso clínico. El aumento del pI de los anticuerpos anti-ANGPTL4 o Fab, de la invención han mejorado su solubilidad, permitiendo a los antiboides que ser formuladas en concentraciones más altas (> 100 mg / ml). Formulación de los anticuerpos a altas concentraciones (por ejemplo,> 100 mg / ml) ofrece la ventaja de ser capaz de 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, como disorderss cardiovascular. PIs más altos también pueden aumentar el

reciclaje FcRn mediada de la versión IgG del anticuerpo permitiendo así el fármaco a persistir en el cuerpo durante una duración más larga, lo que requiere un menor número de inyecciones. Por último, la estabilidad general de los anticuerpos se mejora significativamente debido al pI más alto que resulta en más tiempo de vida útil y la bioactividad in vivo. Preferiblemente, el pI es mayor que o igual a 8,2.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden ser evaluados usando ensayos estándar disponibles en la técnica y/o descritos en este documento, tales como los expuestos en los ejemplos (por ejemplo, ELISA).

Usos profilácticos y terapéuticos

Los anticuerpos que se unen ANGPTL4 como se describe aquí, se pueden utilizar a una concentración terapéuticamente útil para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con el aumento de niveles y / o actividad de ANGPTL4 mediante la administración de una cantidad eficaz de los anticuerpos o de unión a antígeno fragmentos de la invención a un sujeto en necesidad del mismo. La presente invención proporciona un método de tratamiento de trastornos cardiovasculares asociados a ANGPTL4 mediante la administración de una cantidad eficaz de los anticuerpos de la invención a un sujeto en necesidad del mismo. La presente invención proporciona un método de tratamiento de trastornos cardiovasculares asociados a ANGPTL4 mediante la administración de una cantidad eficaz de los anticuerpos de la invención a un sujeto en necesidad del mismo.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse, entre otras cosas, para prevenir tratar, prevenir y mejorar condiciones o trastornos asociados a ANGPTL4, incluyendo pero no limitado a cualquier número de condiciones o enfermedades en las que los niveles de proteína ANGPTL4 son aberrantemente alta y / o en que se solicita una reducción de los niveles de proteína ANGPTL4. Estas condiciones incluyen, pero no se limitan a aquellos que involucran el metabolismo de lípidos, tales como hiperlipidemia, hiperlipoproteinemia y dislipidemia, incluyendo dislipidemia aterogénica, dislipidemia diabética, hipertrigliceridemia (por ejemplo, la hipertrigliceridemia severa (por ejemplo, con TG> 1.000 mg / dL), hipertrigliceridemia asociadas con la obesidad e hipertrigliceridemia Tipo V) hipercolesterolemia, quilomicronemia, dislipidemia mixta (obesidad, síndrome metabólico, diabetes, etc.), lipodistrofia, lipoatrofia, y otras

condiciones causadas por, por ejemplo, disminución de la actividad de LPL y / o deficiencia de LPL, disminución de la actividad del receptor LDL y / o deficiencia de receptor LDL, Apo C2, la deficiencia de ApoE alterado, aumento de ApoB, aumento de la producción y / o disminución de la eliminación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), algunos tratamientos de fármacos (por ejemplo, dislipidemia inducida por el tratamiento con glucocorticoides), cualquier predisposición genética, dieta , estilo de vida, y similares.

Otras enfermedades asociadas a ANGPTL4 o trastornos asociados con o resultantes de la hiperlipidemia, hiperlipoproteinemia, y / o dislipidemia, incluyen, pero no se limitan a, enfermedades o trastornos cardiovasculares, tales como aterosclerosis, aneurisma, hipertensión, angina, accidente cerebrovascular, enfermedades cerebrovasculares, insuficiencia congestiva cardíaca, enfermedades de las arterias coronarias, infarto del miocardio, enfermedades vasculares periféricas, y similares; pancreatitis aguda; esteatohepatitis no alcohólica (EHNA); trastornos de azúcar en la sangre, como la diabetes; obesidad, y similares.

Los anticuerpos de la invención también pueden usarse en combinación con otros agentes para la prevención, tratamiento o mejora de los trastornos asociados a ANGPTL4. Por ejemplo, se pueden usar las terapias de estatina en combinación con los anticuerpos ANGPTL4 y fragmentos de unión a antígeno de la invención para el tratamiento de pacientes con trastornos relacionados con triglicéridos.

Composiciones farmacéuticas

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de unión ANGPTL4 (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 potencializan o estabilizan la composición, o se pueden utilizar para facilitar la preparación de la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes 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 ruta 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 cerca al sitio de la diana. El vehículo farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para la 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 estar recubierta en un material para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

La composición debe ser estéril y fluida. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo un agente que retrase la absorción en la composición, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar de acuerdo con métodos bien conocidos y practicados rutinariamente en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20a ed., 2000; y Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, JR Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferiblemente en condiciones GMP. Típicamente, se emplea una dosis terapéuticamente eficaz o dosis eficaz del anticuerpo de unión a ANGPTL4 en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los anticuerpos de unión a ANGPTL4 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, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones

parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa aquí, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada 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 pueden variarse con el fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado depende 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 del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción compuesto particular que está siendo empleado, 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 historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares.

Un médico o veterinario puede comenzar las dosis de los anticuerpos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que la requerida para lograr 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 los trastornos cardiovasculares descritos en el presente documento varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosis de tratamiento deben titularse para optimizar la seguridad y la eficacia. Para la administración sistémica con un anticuerpo, los intervalos de dosificación de aproximadamente 0,0001 a 100 mg / kg, y más habitualmente de 0,01 a 15 mg / kg, de peso corporal del huésped. Para la administración intravítrea con un anticuerpo, la dosificación puede variar desde 0,1 mg / ojo a 5 mg / 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 ejemplar implica la administración sistémica de una vez por cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración sistémica de una vez por cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses, o según sea necesario (PRN).

El anticuerpo se administra generalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser semanal, mensual o anual. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indique midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpo de unión a ANGPTL4 en el paciente. Además, los intervalos de dosificación alternativos se pueden determinar por un médico y administrados mensual o como sea necesario para ser eficaz. 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 de 25-500 µg / ml. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, que en dicho caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos 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 dosificación relativamente baja se administra en intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento para el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, se requiere una dosificación relativamente alta en intervalos relativamente cortos a veces hasta 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, el paciente se puede administrar un régimen profiláctico.

EJEMPLOS

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

Ejemplo 1: Preparación de ANGPTL4 humana recombinante purificada para su uso como antígeno y en los experimentos de caracterización de anticuerpos

Una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de longitud completa ANGPTL4 humana (aminoácidos 26 a 406, igualando NCBI secuencia NM_139314.2) con el péptido señal N-terminal de humano IgG-kappa (MKTFILLLWVLLLWVIFLLPGATA) (SEQ ID NO: 152), y epítope C-terminal FLAG (DYKDDDDKH) (SEQ ID NO: 153), etiqueta de purificación de hexahistidina (HHHHHH) (SEQ ID NO: 154), y la etiqueta Avi (es decir, secuencia de biotinilación BirA GGGLNDIFEAQKIEWHE) (SEQ ID NO: 155) se subclonó en el vector de expresión de células de mamíferos pRS5a para generar el plásmido pRS-Ikk-hANGPTL4 (26-406) FLAG-6HIS-Avi contiene una secuencia señal de 20 aminoácidos IKK seguido por los aminoácidos 26- 406 de ANGPTL4 humana con carboxilo-terminal de la bandera, 6HIS, y las etiquetas de AVI (Tabla 2, SEQ ID NO: 156).

Para algunas preparaciones, se utilizaron los siguientes procedimientos para expresar, purificar y biotinilar a la proteína ANGPTL4 humana (Método 1): Células HEK293T Suspensión-adaptadas se cultivaron en medio de expresión libre de suero FreeStyle 293 (Life Technologies, número de catálogo 12338-018) y transfectadas con el plásmido PRS-Ikk-hANGPTL4 (26-406) FLAG-His6-Avi usando reactivo de transfección polietilenimina (Polysciences, número de catálogo 23966). Cinco horas después de la transfección, (Alfa Aesar, número de catálogo A16198) se añadió heparina al medio de cultivo a una concentración final de 0,5 mg / ml. Las células se cultivaron a continuación por 72-96 horas y luego el sobrenadante del cultivo de células se recogió por centrifugación a 4 °C y esterilizada por filtración usando un filtro de 0,22 micras (Thermo, número de catálogo 567-0010). A continuación, el sobrenadante del cultivo celular filtrado se concentró a aproximadamente 100 ml por filtración de flujo tangencial. El sobrenadante concentrado se diluyó a un volumen de 1 litro con tampón TBS-glicerol (50 mM Tris-HCl, NaCl 150 mM, y 15% de glicerol, pH

7,4), y la muestra se concentró a aproximadamente 200 ml por filtración de flujo tangencial. se añadió a la muestra resina de agarosa Anti-Flag M2 (Sigma, número de catálogo 220102-177) pre-equilibrada con tampón TBS-glicerol a continuación, y la solución resultante se mezcló suavemente durante 1 hora a 4 °C. Después, la resina de agarosa se lavó 5 veces con 25 ml TBS-glicerol, y la proteína de ANGPTL4 unida se eluyó con 20 ml TBS-glicerol que contiene 0,2 mg/ml de péptido Flag (Sigma, número de catálogo 220176-317). (AppliChem, se añadió libre de peróxido Tween-20 número de catálogo A1284,0025 a la solución de proteína se eluyó a una concentración final de 0,1%, y la solución resultante se cargó en una columna HiTrap heparina de 5 ml (GE Lifesciences, número de catálogo 17- 0407-01), que fue pre-equilibrada en TBS-glicerol que contiene 0,1% de Tween-20 (Tampón A). La columna se lavó con 50 ml de Tampón A, seguido por 50 ml de tampón A NaCl. La proteína ANGPTL4 300 mM contenida fue entonces eluida con 20 ml de tampón A que contiene NaCl 600 mM. La proteína eluida se concentró usando un concentrador centrífugo con un corte de peso molecular 30 kDa (Amicon, número de catálogo Ultra UFC903024). La pureza de la proteína purificada ANGPTL4 como se evaluó por SDS-PAGE fue> 90%.

Para algunas aplicaciones, las proteínas fueron ANGPTL4 específicas al sitio biotinilado en la etiqueta C-terminal Avi usando 10 µg de ligasa purificada-proteína biotina (BirA) (avidez) por mg de ANGPTL4. El tampón se complementa con concentraciones finales de ATP 10 mM, acetato de magnesio 10 mM, y d-biotina 0,5 M. La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a 30 °C y luego durante la noche a 4 °C, luego se cargó en una columna de HiLoad Superdex 200 (26 mm x 600 mm) (GE Lifesciences, número de catálogo 28-9893-36) que fue equilibrada en tampón A. Las fracciones de la columna de Superdex 200 se analizaron mediante SDS-PAGE, y las fracciones que contienen ANGPTL4 se reunieron y concentraron usando un concentrador centrífugo.

Para otras preparaciones, se utilizaron los siguientes procedimientos para expresar, purificar y biotinilar la proteína de ANGPTL4 humana (Método 2). El plásmido pRS-Ikk-hANGPTL4 (26-406) C-Flag6HisAvi se transfectó transitoriamente en células HEK293T utilizando métodos de transfección estándar polietilenimina (PEI). Las células fueron propagadas en cultivo en suspensión en medio 293 Freestyle y la transfección se llevó a cabo en 1 x 10^6 células / ml de concentración final de células en

4 litros de medio utilizando frascos de 1 litro. Cinco horas después de la transfección, la heparina a una concentración final de 500 µg / ml se añadió. Las células se cultivaron a 37 °C y 5% de CO_2 durante 72 hr. Las células se sedimentaron entonces por centrifugación, y el sobrenadante se pasó a través de un filtro estéril de 0,22 µm. El sobrenadante clarificado se concentró y se intercambió el tampón en tampón B (Tris-HCl 50, NaCl 150 mM, glicerol al 10%, imidazol 10 mM, pH 7,4) usando filtración de flujo tangencial (TFF). A continuación, la muestra concentrada se pasó sobre una columna de afinidad Ni-NTA de 5 ml equilibrada con Tampón C (50 mM Tris.HCl, NaCl 150 mM, glicerol al 10%, imidazol 10 mM, 0,1% n-octil-β-maltósido, pH 7,4). Después de cargar la muestra, la columna se lavó con el mismo tampón hasta que la absorbancia inicial a 280 nm fue alcanzado. La proteína ANGPTL4 unida se eluyó usando un gradiente de imidazol (10 mM a 500 mM). Las fracciones de elución que contenían ANGPTL4 humana se combinaron, se concentraron usando un concentrador Amicon (peso molecular de corte 10 kD), con intercambio de tampón usando columnas PD-10 en tampón de almacenamiento (50 mM Tris-HCl, NaCl 150 mM, 15% de glicerol, pH 7,4), se dividió en alícuotas, congelado rápidamente en nitrógeno líquido, y se almacenó a -80 °C. La pureza de la proteína de ANGPTL4 humana purificada tal como se evaluó por SDS-PAGE fue> 90%.

Para algunas aplicaciones, la proteína de ANGPTL4 purificada preparada como se describe anteriormente fue específicamente biotinilado en un sitio como sigue: se purificó proteína en tampón Bicina 50 mM, pH 8,3 a una concentración final de aproximadamente 1 mg/ml se incubó en presencia de ATP 10 mM, acetato de magnesio10 mM, biotina 0,1 mM, y BirA ligasa de biotina (avidez) a 30 °C durante 1 hora y luego a 4 °C durante la noche. A continuación, la proteína se concentró usando un concentrador Amicon (peso molecular de corte 10 kD), intercambiado con tampón usando columnas PD-10 en tampón de almacenamiento (50 mM Tris-HCl, NaCl 150 mM, 15% de glicerol, pH 7,4), se dividió en alícuotas , congelado rápidamente en nitrógeno líquido y se almacena a -80 °C.

Ejemplo 2: Preparación de la proteína recombinante purificada ANGPTL4 humana de dominio N-terminal espiral para su uso en experimentos de caracterización de anticuerpos

La expresión, purificación y biotinilación de la espiral de la bobina de dominio N-terminal de ANGPTL4 humana (aminoácidos 26 a 161) se llevó a cabo utilizando esencialmente los mismos métodos descritos para ANGPTL4 humana de longitud completa humana en el Ejemplo 1, Método 2. La secuencia del dominio N-terminal de la proteína purificada ANGPTL4 humana se muestra en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 157).

Tabla 2. secuencias de aminoácidos de ANGPTL4 humana (26 a 406) FLAG-His6-Avi (el péptido señal se pone de relieve por el subrayado, y la secuencia QP N-terminal después del péptido señal y las secuencias del C-terminal FLAG-His6-Avi se resaltan con cursiva)

Constructo	SEQ ID NO.	Secuencia de Aminoácidos
ANGPTL4 humana (26-406) FLAG-His6-Avi	156	MKTFILLLWVLLLWVIFLLPGATA*QP*GPVQSKSPRFAS WDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALERRL SACGSACQGTEGSTDLPLAPESRVDPEVLHSLQTQLK AQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLL DHKHLDHEVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRLHR LPRDCQELFQVGERQSGLFEIQPQGSPPFLVNCKMTS DGGWTVIQRRHDGSVDFNRPWEAYKAGFGDPHGEF WLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVH LGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPSGLSVPFSTW DQDHDLRRDKNCAKSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYF RSIPQQRQKLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMA AEAASDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE
ANGPTL4 humana (26-161) FLAG-His6-Avi	157	MKTFILLLWVLLLWVIFLLPGATA*QP*GPVQSKSPRFAS WDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALERRL SACGSACQGTEGSTDLPLAPESRVDPEVLHSLQTQLK AQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLL DHKHLDHEVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRLHR LPRDYKDDDDKHHHHHHDYKDDDDKHHHHHHGGGL NDIFEAQKIEWHE

Ejemplo 3: Preparación y selección de anticuerpos monoclonales

La proteína recombinante ANGPTL4 humana se preparó en casa como se describe en el Ejemplo 1, y fue utilizada como inmunógeno para la generación de clones de hibridoma anti-ANGPTL4. Ratones transgénicos Bcl-2 fueron inmunizados con ANGPTL4 humana recombinante de acuerdo con un protocolo de inmunización rápido estándar. Los hibridomas fueron generados mediante el uso de un método basado en electrofusión estándar.

Células CHO-K1PD que expresan establemente ANGPTL4 humana fusionada a un dominio transmembrana se generaron utilizando métodos estándar. Debido a la presencia del dominio transmembrana, estas células muestran ANGPTL4 en la superficie celular. Por lo tanto, la unión de anticuerpos a ANGPTL4 en la superficie de estas células puede ser detectada usando citometría de flujo.

Los sobrenadantes del hibridoma se cribaron mediante la detección de unión de los anticuerpos presentes en el sobrenadante a ANGPTL4 humana expresada en la superficie de las células CHO-K1PD. La unión de anticuerpos a las células se detectó usando un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con fluorescencia y citometría de flujo. Las células CHO-K1PD parentales que no expresan ANGPTL4 se utilizaron como un control negativo. Para los hibridomas que se unían a ANGPTL4, los anticuerpos se purificaron a partir de sobrenadantes de células utilizando métodos estándar, y el sobrenadante enriquecido resultante se ensayó en el ensayo de citometría de flujo con células / ANGPTL4 y CHO-K1PD- CHO-K1PD parentales.

Los títulos de los anticuerpos ANGPTL4 en sobrenadantes de hibridoma se determinaron usando un ensayo de ELISA directo estándar, en el que la proteína ANGPTL4 humana recombinante se inmovilizó sobre la superficie de la placa de ELISA. Los hibridomas positivos confirmados se subclonaron, y las secuencias de los anticuerpos monoclonales producidos por estos hibridomas se determinaron usando métodos estándar.

Los anticuerpos monoclonales 14P18, 17B1, 19C16 y 37P1 se muestran posteriormente para inhibir ANGPTL4 humana mediada por la inhibición de la lipoproteína lipasa humana utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 7 a continuación. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las regiones

variables de cadena pesada y ligera de 14P18, 17B1, 19C16 y 37P1 se determinaron usando métodos estándar.

Ejemplo 4: Humanización de anticuerpos monoclonales

El proceso de humanización está bien descrito en la técnica (Jones, et al 1986, Queen, et al 1989, Riechmann, et al 1988, Verhoeyen, Milstein y Winter 1988). El término humanización se describe como la transferencia del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo no humano, por ejemplo, un anticuerpo murino derivado, a un marco aceptor humano, por ejemplo, una secuencia de la línea germinal humana (Retter, et al 2005). La razón principal para la humanización de un anticuerpo es reducir al mínimo el riesgo de desarrollar una respuesta inmunogénica hacia el anticuerpo cuando el anticuerpo se administra como un agente terapéutico en los seres humanos (Rebello, et al 1999).

El sitio de unión al antígeno comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) (Chothia y Lesk 1987, Kabat, et al 1991) y posiciones en la región marco de los dominios variables (VL y VH) que directa o indirectamente afectan a la unión. Los residuos estructurales que pueden afectar directamente la unión pueden, por ejemplo, encontrarse en la llamada región de bucle "exterior" que se encuentra entre CDR2 y CDR3. Los residuos que afectan indirectamente a la unión son, por ejemplo, se encuentran en las denominadas Zonas Vernier (Foote y Winter 1992). Se cree que apoyar la conformación de CDR. Esas posiciones fuera de las CDRs se toman en cuenta al elegir un marco aceptor adecuado para reducir al mínimo el número de desviaciones del anticuerpo humanizado final a la secuencia aceptora de la línea germinal humana en las regiones de marco.

Ejemplo 5: Optimización de la secuencia de los anticuerpos y maduración de la afinidad

Ciertos residuos de la secuencia de aminoácidos se conoce que se someten a una modificación post-traduccional (PTM), tales como la glicosilación (por ejemplo NxS/T, donde X es cualquier aminoácido excepto P), la oxidación de cisteínas libres, desamidación (por ejemplo, desamidación de N en las secuencias ng) o isomerización (por ejemplo, en la Dirección General de secuencias). Si están presente en las

regiones CDR, esos motivos son eliminados idealmente por mutagénesis dirigida al sitio con el fin de aumentar la homogeneidad del producto.

El proceso de maduración de la afinidad está bien descrito en la técnica. Entre muchos de los sistemas de visualización, presentación de fagos (Smith 1985) y expresión en células eucariotas tales como levadura (Boder y Wittrup 1997) son los sistemas más comúnmente aplicados para seleccionar para la interacción antígeno-anticuerpo. Las ventajas de estos sistemas de visualización son que son adecuados para una amplia gama de antígenos y que la rigurosidad de la selección se puede ajustar fácilmente. En la presentación en fagos, los fragmentos scFv o Fab se pueden visualizar en la pantalla y la scFv, Fab o IgG de levadura de longitud completa se pueden visualizar. Estos métodos comúnmente aplicados permiten la selección de variantes de anticuerpos deseados de las bibliotecas más grandes con diversidad de más de 1×10^7. Las bibliotecas con la diversidad más pequeña (por ejemplo, 1000) puede ser seleccionadas mediante micro-expresión y ELISA.

Bibliotecas no dirigidas o variantes de anticuerpos al azar propensas a errores se pueden generar por ejemplo por PCR (Cadwell y Joyce 1994) y proporcionan un enfoque muy simple, pero a veces limitado. Otra estrategia es la diversificación CDR dirigida de un candidato de anticuerpos. Uno o más posiciones en una o más CDR pueden ser dirigidos específicamente para el uso de oligonucleótidos degenerados de ejemplo (Thompson, et al 1996), mutagénesis de trinucleótido (TRIM) (Kayushin, et al 1996), o cualquier otro enfoque conocido en la técnica.

Ejemplo 6: Expresión y purificación de anticuerpos humanizados

Secuencias de ADN que codifican los dominios VL y VH humanizados fueron ordenadas en GeneArt (Life Technologies, Inc., Regensburg, Alemania), incluyendo la optimización de codones para *Homo Sapiens*. Las secuencias que codifican los dominios VL y VH se subclonaron cortando y pegando partir de los vectores derivados GeneArt en vectores de expresión adecuados para la expresión y la secreción por las células de mamíferos. Las cadenas pesadas y ligeras fueron clonadas en vectores de expresión individuales para permitir la co-transfección. Los elementos del vector de expresión incluyen un promotor (citomegalovirus (CMV) potenciador-promotor), una

secuencia señal para facilitar la secreción, una señal de poliadenilación y terminador de la transcripción (a partir del gen de hormona de crecimiento bovina (BGH)), un elemento que permite la replicación episomal y la replicación en procariotas (por ejemplo, origen SV40 y ColE1 u otros conocidos en la técnica) y elementos para permitir la selección (gen de resistencia a ampicilina y el marcador de zeocina).

Las células embrionarias de riñón humano constitutivamente expresan el antígeno T grande de SV40 (HEK293-T ATCC11268) son una de las líneas de células hospederas preferidas para la expresión transitoria de proteínas IgG humanizadas y/o optimizadas. La transfección se realiza usando PEI (polietilenimina, 25.000 MW lineal, Polysciences, EE.UU., número de catálogo 23966) como reactivo de transfección. La solución madre de PEI se prepara disolviendo cuidadosamente 1 g de PEI en 900 ml de agua de grado de cultivo de células a temperatura ambiente (RT). Para facilitar la disolución de PEI, la solución se acidifica por adición de HCl a pH 3-5, seguido de neutralización con NaOH a un pH final de 7,05. Finalmente, se ajusta el volumen a 1 l y la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micras, se toman alícuotas y se congela a -80 °C hasta su uso posterior. Las células HEK 293T se cultivan utilizando un medio de cultivo de Novartis patentado libre de suero para la transfección y propagación de las células, y medio de cultivo ExCell VPRO libre de suero (SAFC Biosciences, EE.UU., art 24561C) como medio de producción/alimentación. Las células preparadas para transfecciones transitorias se cultivan en cultivo en suspensión. Para transfecciones a pequeña escala (<5L), las células se cultivan en matraces de agitación Corning (Corning, Tewksbury, MA) en un agitador orbital (100-120 rpm) en un incubador humidificado a 5% de CO_2 (matraces de siembra). Las células en los cultivos de siembra se deben mantener en la fase de crecimiento exponencial (densidades celulares entre 5 x 10^5 / ml y 3 x 10^6 / ml) y mostrar una viabilidad de> 90% para la transfección. Para transfección a pequeña escala (<5 L) una alícuota de células se saca de los cultivos de siembra y se ajustó a 1,4 x 10^6 células/ml en 36% del volumen final con medio de cultivo libre de suero de Novartis. La solución de ADN (Solución 1: 0,5 mg de cadena pesada y 0,5 mg de plásmido de expresión de cadena ligera para una transfección de 1 L) se prepara diluyendo el ADN a 1 mg / l (volumen final) en 7% del volumen de cultivo final seguido por mezcla suave. Para evitar la contaminación bacteriana, esta solución se filtra usando un filtro de 0,22 micras (por ejemplo, Millipore Stericup). Luego de 3 mg/L (volumen final) de la solución de PEI también se diluye en 7% del volumen de cultivo final y se mezcló suavemente

(Solución 2). Ambas soluciones se incuban durante 5-10 min a temperatura ambiente (RT). A partir de entonces la solución 2 se añade a la solución 1 con mezcla suave y se incuba durante otros 5-15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de transfección se añade a continuación a las células y el cultivo de las células se continuó durante 4 a 6 horas. Por último, el 50% restante del volumen de producción total se logra mediante la adición de medio de cultivo libre de suero ExCell® VPRO. El cultivo celular se continuó durante once días después de la transfección.

El cultivo se recoge por centrifugación a 4500 rpm durante 20 minutos a 4 °C (Heraeus®, Multifuge 3 SR, Thermo Scientific, Rockford, IL). El sobrenadante de células recuperado se filtra estéril a través de un filtro de Stericup (0,22 m) y se almacenó a 4 °C hasta su posterior procesamiento. La purificación se realizó en un sistema de cromatografía "ÄKTA 100 Explorador de Air" a 4 °C en un armario de refrigeración, utilizando una columna de HiTrap 5 ml recién desinfectados (0,25 M NaOH) Proteína A MabSelect®SuRe. La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de tampón fosfato salino (PBS, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA), y luego el sobrenadante filtrado estéril se cargó a 4,0 ml/min. La columna se lavó con 13 volúmenes de columna de PBS. A continuación, los anticuerpos se eluyeron con 5 volúmenes de columna de citrato 50 mM, NaCl 70 mM, pH 3,2. El eluato se recogió en fracciones de 3 ml y se ajustó a pH 7 con Tris-HCl1 M, pH 10. El anticuerpo que contiene las fracciones se agrupaó y esterilizó por filtración (Millipore Steriflip, 0,22 um), la DO 280 nm se midió utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000), y la concentración de proteína se calculó sobre la base de la DO 280 y el coeficiente de extinción molar que se calculó en base a la secuencia de la proteína. El eluato fue probado para la agregación por cromatografía de exclusión de tamaño con multi-ángulo detector de dispersión de luz (SEC-MALS) y la pureza se evaluó por electroforesis en gel (SDS-PAGE), ensayo de endotoxina (LAL) y espectrometría de masas (MS). Para la segunda etapa de purificación, si es necesario, el anticuerpo de la primera purificación se cargó en una columna de gel viltration (NaOH 0,5 M) recién desinfectada (Hi Load 16/60 Superdex 200, 120 mL, GE-helthcare). La columna se equilibró con PBS y se realizó la corrida con tampón de PBS a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El eluato se recogió en fracciones de 1,2 ml. Las proteínas que contienen anticuerpos se agruparon, y el anticuerpo purificado resultante se analizó como se describe para la primera etapa de purificación.

Utilizando los métodos descritos anteriormente, se prepararon los siguientes anticuerpos humanizados, expresados y purificados: NEG276, NEG276-LALA, NEG278, NEG310, NEG318, NEG318-LALA, NEG319, NEG313, y NEG315. Los anticuerpos de marco y parentales para estos anticuerpos humanizados se muestran en la Tabla 3, y las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se muestran en la Tabla 1. Todos los anticuerpos humanizados se prepararon como anticuerpos IgG1 humano, a excepción de NEG276-LALA y NEG318-LALA, que fueron preparados usando una región Fc modificada (IgG1 humana-LALA) en el que la secuencia de Leu234-Leu235 en la cadena pesada se sustituye por Ala234-Ala235. Se sabe que los anticuerpos IgG1-LALA humanos han reducido la función efectora de los anticuerpos en comparación con los anticuerpos IgG1 humana de tipo silvestre.

Tabla 3. anticuerpos ANGPTL4 humanizados de la invención.

Anticuerpo	VH SEQ ID NO.	VL SEQ ID NO.	Marco	Anticuerpo Parental
NEG276	13	23	hIgG1 / kappa	19C16
NEG276-LALA	13	23	hIgG1-LALA / kappa	19C16
NEG278	38	48	hIgG1 / kappa	19C16
NEG310	58	68	hIgG1 / kappa	17B1
NEG313	78	88	hIgG1 / kappa	37P1
NEG315	98	108	hIgG1 / kappa	37P1
NEG318	118	128	hIgG1 / kappa	14P18
NEG319	138	148	hIgG1 / kappa	14P18

Ejemplo 7: Ensayo de la lipoproteína lipasa humana

Células HEK 293T cultivadas en un medio de expresión FreeStyle (Invitrogen) fueron transfectadas con un plásmido que codifica la expresión en mamíferos de a largo plazo de polipéptido de lipoproteína lipasa humana (LPL) (que coincide con la secuencia NCBI NM_000237.2) utilizando un método de transfección estándar de polietilenimina (PEI). A las 24 horas después de la transfección, se añadió heparina al medio de cultivo a una concentración final de 3U/ ml, para mejorar la liberación de hLPL secretada de la superficie celular. En 60 horas después de la transfección, se recogió el medio de cultivo, se filtró usando un filtro de 0,2 micras, y se añadió glicerol a una concentración final de 10% v/v. La solución resultante se cargó en una columna de 5 ml HiTrap Heparin Sepharose (GE), que había sido pre-equilibrada con tampón A (Tris-HCl 50, NaCl 200 mM, 10% v/v de glicerol, pH 7,2). La columna se lavó con Tampón A, y la proteína LPL humano era entonces eluida con gradientes de paso de NaCl 500 mM, NaCl 1 M y NaCl 2 M en tampón A. La LPL humano más pura y catalíticamente activa se eluyó a NaCl 2M. Las alícuotas de LPL humana purificada eran congeladas rápidamente y almacenados a -80 °C hasta su uso.

Se utilizó el siguiente protocolo para evaluar la capacidad de los anticuerpos de la invención para bloquear la inhibición de ANGPTL4 de la lipoproteína lipasa humana. La placa de ensayo de 384 pozos (Corning, número de catálogo 3573) y la placa de muestra (Greiner Bio-One, número de catálogo 781201) se lavaron con albúmina de suero bovino 1% (BSA) (0,1 ml por pocillo) durante 30 min a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas dos veces con solución de Tween-20 al 0,05%.

Anticuerpo ANGPTL4 en HEPES 100 mM, pH 7,0 (20 µl por pocillo, dilución en serie con las concentraciones de ensayo finales oscilan entre 0.02 y 500 nM) se añadió a la placa de muestra, seguido por 20 µl proteína ANGPTL4 humana (10 nM concentración final de ensayo) en tampón de ensayo (HEPES 100 mM, MgCl2 2 mM, pH 7,0), y la placa se incubó durante 20 min a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación se añadió la lipoproteína lipasa diluida en tampón de ensayo (20 µl) y la placa se incubó durante 10 min a temperatura ambiente con agitación suave.

Una mezcla enzimática de acoplamiento contiene acil-coenzima A oxidasa (Sekisui Diagnostics, número de catálogo T-17), acil-coenzima A sintetasa (Sekisui Diagnostics, número de catálogo T-16), y peroxidasa de rábano picante (Sekisui Diagnostics), ATP (Sigma, catálogo número A7699) y la coenzima A (MP Biomedicals, número de catálogo 100493) en tampón de ensayo se preparó. Perlas de agarosa catalasa (Sigma, número de catálogo C9284) se añadieron a la mezcla de enzimas de acoplamiento, y la mezcla se incubó a 4 °C durante 30 min con agitación, y las perlas de agarosa catalasa se separaron después por centrifugación.

VLDL humana (Millipore, número de catálogo LP1) se diluyó en tampón de ensayo, se trató con perlas de agarosa de catalasa durante 30 min, y las perlas se retiran de la solución por centrifugación. Amplex Red (Invitrogen, número de catálogo A12222) en tampón de ensayo se añadió a una concentración de 33 µM.

A la solución en la placa de muestra que contiene LPL, ANGPTL4 y el anticuerpo ANGPTL4, se añadió mezcla enzimática de acoplamiento (20 µl), y 54 µl de la solución resultante se transfirieron a la placa de ensayo. Para iniciar la reacción de la lipoproteína lipasa, se añadió solución de VLDL / Amplex Red (18 µl), y la fluorescencia de resorufina se monitorizó continuamente durante 30 minutos utilizando un lector de placas de múltiples pozos EnVision (Perkin Elmer). Las concentraciones finales del ensayo fueron: 9,4 nM ANGPTL4, ~ 4 nM de lipasa lipoproteína humana, 2,3 µg / ml VLDL humana, 0,75 mM de ATP, 90 µM coenzima A, 0,5 U / ml ACO, 1,25 U / ml AEC, 1,2 U / ml HRP, y 10 µM Amplex Red.

La fluorescencia resultante de resorufina vs. datos de tiempo se utilizó para determinar la actividad de la enzima lipoproteína lipasa (velocidad inicial) para cada muestra. Se utilizaron muestras de control sin LPL (control de fondo) o sin ANGPTL4 o anticuerpos ANGPTL4 (LPL) de control de la actividad para normalizar la actividad de la enzima, que se expresó como un porcentaje de la actividad de control de LPL. Los datos de actividad de la enzima para diferentes concentraciones de anticuerpos ANGPTL4 se representaron usando software GraphPad Prism, y los datos se ajustaron a generar un valor de EC_{50} para el aumento mediado por anticuerpos ANGPTL4 en actividad de la enzima lipoproteína lipasa. En este ensayo, ANGPTL4 humana en concentración 10 nM típicamente inhibe la actividad de LPL por 70-95%. Los anticuerpos ANGPTL4 de la invención dependiente de la dosis invirtieron

inhibición de LPL por ANGPTL4. resultados de CE_{50} de este ensayo se muestran en la Tabla 4. Los datos representativos para anticuerpos seleccionados de la invención se muestra en la Figura 1.

Tabla 4. anticuerpos ANGPTL4 de la invención que bloquean a inhibición de ANGPTL4 humana de la lipoproteína lipasa (LPL).

Anticuerpo	ANGPTL4 humana CE_{50} (nM)
NEG276	0.6
NEG276-LALA	0.7
NEG278	0.7
NEG310	16
NEG313	3
NEG315	3
NEG318	1.4
NEG319	0.5

Ejemplo 8: Preparación de las proteínas ANGPTL4 de mono cynomolgus, ratón y rata y ANGPTL3 humana para uso en la caracterización de anticuerpos

La secuencia de ANGPTL4 de cynomolgus se determinó mediante la amplificación de la secuencia del gen de una biblioteca de ADNc de hígado de cynomolgus (Biochain, número de catálogo C1534149-Cy, lote No B409051). Los cebadores 5-UT-Cyno 5'-ATCCCCGCTCCCAGGCTAC-3' (SEQ ID NO: 158) y 3-UT-cyno 5'-CAGCAAGGAGTGAAG-CTCCATGCC-3 '(SEQ ID NO: 159) se diseñaron basándose en las regiones no traducidas 5' y 3' (secuencia de ADNc de ANGPTL4 humana NCBI NM_139314. 2). El producto de PCR purificado en gel se ligó en pCR4-TOPO-Blunt (Life Technologies, número de catálogo K2875-40) y se secuenció. El ADNc clonado de ANGPTL4 de mono cynomolgus codifica una proteína de 406 aminoácidos con 95% de homología con la ANGPTL4 humana. La secuencia de ácido

nucleico que codifica a los 26 a 406 aminoácidos de ANGPTL4 de mono cynomolgus se subclonó en el vector de expresión de mamífero pRS5, para producir el plásmido pRS-Ikk-cynoANGPTL4 (26-406) FLAG-6HIS-Avi, que tiene una secuencia señal Ikk de 20aminoácidos, los aminoácidos 26 a 406 de ANGPTL4 cyno, y FLAG carboxilo-terminal, 6HIS, y las etiquetas de AVI (SEQ ID NO: 160 en la Tabla 5).

La proteína de mono cynomolgus ANGPTL4(26-406)FLAG-6HIS-Avi se expresó y purificó utilizando métodos similares a los descritos para proteína ANGPTL4(26-406) FLAG-6HIS-Avi humana en el Ejemplo 1. Para algunas aplicaciones, la proteína purificada ANGPTL4 de mono cynomolgus se biotiniló específicamente en un sitio usando un método similar al descrita para la proteína de ANGPTL4 humana en el Ejemplo 1. La pureza de la proteína purificado de ANGPTL4 de mono cynomolgus tal como se evaluó por SDS-PAGE fue> 90%.

La proteína ANGPTL4(26-161)FLAG-6HIS-Avi de Cynomolgus se preparó usando métodos similares. La secuencia de la proteína ANGPTL4 (26-161) de cynomolgus codificada por su constructo de expresión correspondiente se muestra en la Tabla 5 (SEQ ID NO: 161)

La expresión, purificación y biotinilación de ANGPTL4 de ratón (aminoácidos 26-410) y ANGPTL4 de rata (aminoácidos 24 a 405) se llevó a cabo usando esencialmente los mismos métodos como se describe para ANGPTL4 humana en el Ejemplo 1, Método 2. Las secuencias de la las proteínas ANGPTL4 de ratón y de rata codificadas por la expresión de los constructos correspondientes se muestran en la Tabla 5 (SEQ ID NO: 162 y 163, respectivamente). La pureza de las proteínas ANGPTL4 de ratón y ANGPTL4 de rata purificadas según la evaluación de SDS-PAGE fue> 90%.

ANGPTL3 (SEQ ID NO: 5, Tabla 1) es una proteína humana que está estrechamente relacionada con ANGPTL4. Para permitir la evaluación de la posible unión de los anticuerpos de la invención para ANGPTL3, una proteína ANGPTL3(14-460)FLAG-His-Avi humano (SEQ ID NO: 164, Tabla 5) fue expresada, purificada y biotinilado utilizando métodos similares a los descritos para ANGPTL4 humana en el Ejemplo 1, Método 2.

Tabla 5. Las secuencias de aminoácidos de ANGPTL4(26-406)FLAG-His6-Avi de macaco, ANGPTL4(26-410)FLAG-His6-Avi de ratón, ANGPTL4(24-405)FLAG-His6-Avi de rata, y ANGPTL3(17-460)FLAG-His-Avi humana (los péptidos señal se destacan por subrayado, y la secuencia de QP N-terminal después del péptido señal y las secuencias FLAG-His6-Avi C-terminal se destacan con letra cursiva)

Constructo	SEQ ID NO.	Secuencia de Aminoácidos
ANGPTL4 macaco (26-406) FLAG-His6-Avi	160	MKTFILLLWVLLLWVIFLLPGATA*QP*GPVQSKSPRFA SWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLNALER RLSACGSACQGTEGSTALPLAPESRVDPEVLHSLQT QLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQRLQSQ VGLLDPKHLDHEVAKPARRKRRPEMAQPVDSAHNA SRLHRLPRDCQELFEDGERQSGLFEIQPQGSPPFLV NCKMTSDGGWTVIQRRHDGSVDFNRPWEAYKAGF GDPQGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLQDWDG NAESLQFSVHLGGEDTAYSLQLTEPVASQLGATTVP PSGLSVPFSTWDQDHDLRRDKNCAKSLSGGWWFG TCSHSNLNGQYFRSIPQQRQELKKGIFWKTWRGRY YPLQATTMLIQPTAAEAASDYKDDDDKHHHHHHGG GLNDIFEAQKIEWHE
ANGPTL4 macaco (26-161) FLAG-His6-Avi	161	MKTFILLLWVLLLWVIFLLPGATA*QP*GPVQSKSPRFA SWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLNALER RLSACGSACQGTEGSTALPLAPESRVDPEVLHSLQT QLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQRLQSQ VGLLDPKHLDHEVAKPARRKRRPEMAQPVDSAHNA SRLHRLPRDYKDDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIE WHE
Ratón ANGPTL4 (26-410) FLAG-His6-Avi	162	MKTFILLLWVLLLWVIFLLPGATA*QP*RPAQPEPPRFA SWDEMNLLAHGLLQLGHGLREHVERTRGQLGALER RMAACGNACQGPKGKDAPFKDSEDRVPEGQTPET LQSLQTQLKAQNSKIQQLFQKVAQQQRYLSKQNLRI QNLQSQIDLLAPTHLDNGVDKTSRGKRLPKMTQLIG LTPNATHLHRPPRDCQELFQEGERHSGLFQIQPLGS PPFLVNCEMTSDGGWTVIQRRLNGSVDFNQSWEAY KDGFGDPQGEFWLGLEKMHSITGNRGSQLAVQLQD

		WDGNAKLLQFPIHLGGEDTAYSLQLTEPTANELGAT NVSPNGLSLPFSTWDQDHDLRGDLNCAKSLSGGW WFGTCSHSNLNGQYFHSIPRQRQERKKGIFWKTWK GRYYPLQATTLLIQPMEATAASDYKDDDDKHHHHHH GGGLNDIFEAQKIEWHE
ANGPTL4 Rat (24-405) FLAG-His6-Avi	163	MKTFILLLWVLLLWVIFLLPGATA*QP*QGRPAQPEPPR FASWDEMNLLAHGLLQLGHGLREHVERTRGQLGAL ERRMAACGNACQGPKGTDPKDRVPEGQAPETLQS LQTQLKAQNSKIQQLFQKVAQQQRYLSKQNLRIQNL QSQIDLLTPTHLDNGVDKTSRGKRLPKMAQLIGLTPN ATRLHRPPRDCQELFQEGERHSGLFQIQPLGSPPFL VNCEMTSDGGWTVIQRRLNGSVDFNQSWEAYKDG FGDPQGEFWLGLEKMHSITGDRGSQLAVQLQDWD GNAKLLQFPIHLGGEDTAYSLQLTEPTANELGATNVS PNGLSLPFSTWDQDHDLRGDLNCAKSLSGGWWFG TCSHSNLNGQYFHSIPRQRQQRKKGIFWKTWKGRY YPLQATTLLIQPMEATAASDYKDDDDKHHHHHHGG GLNDIFEAQKIEWHET
ANGPTL3 Humano (17-460)	164	MKTFILLLWVLLLWVIFLLPGATA*QP*SRIDQDNSSFD SLSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFVHK TKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRR TTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLLEEKILLQQKV KYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLKTFVEKQDNSI KDLLQTVEDQYKQLNQQHSQIKEIENQLRRTSIQEPT EISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIY NRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQ HRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIY SIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNY TLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNC PEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPE RRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFEDYK DDDDKHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

Ejemplo 9: Caracterización de la especificidad de unión de anticuerpos mediante ensayos directos de ELISA

Se llevaron a cabo ensayos directos de ELISA para caracterizar la especificidad de unión del anticuerpo de los anticuerpos seleccionados de la invención. El ensayo se realizó como sigue. A Meso Escala Descubrimiento (MSD) placa recubierta con estreptavidina de 384 pocillos fue bloqueado por la incubación de la placa con 50 µL tampón de bloqueo (PBS, pH 7,4, 5% w / v albúmina de suero bovino) por pozo a 22 °C durante 1 hora con agitación constante (600 rpm). La placa MSD bloqueada se lavó 3 veces con tampón de lavado (PBS, pH 7,4 y 0,05% v / v de Tween-20) usando un lavador de placas (BioTek). Después del lavado, las proteínas de ANGPTL4 humanos biotinilados diluidos en tampón de ensayo (PBS, pH 7,4 sin $CaCl_2$ o $MgCl_2$, 0,5% w / graso albúmina de suero bovino libre de ácidos v y 0,02% v / v de Tween-20) fueron inmovilizados en la superficie por incubación en concentración 1 nM (15 µL por pozo) a 22 °C durante una hora: integral ANGPTL4 humana (hANGPTL4), dominio espiral de ANGPTL4 humana (hANGPTL4-CCD) y de longitud completa ANGPTL3 humana (hANGPTL3). A continuación, la placa se lavó 3 veces como se describió anteriormente. Entonces el anticuerpo diluido a concentración de 1 nM en tampón de ensayo se aplicó a la placa MSD (15µL por pocillo), y la placa se incubó durante 1 hora a 22 °C con agitación constante (600 rpm). Los anticuerpos unidos se detectaron mediante la adición de 15 µL por pozo de una dilución 1:500 de cabra marcado con sulfo anti-IgG humana. La placa se incubó durante una hora con agitación constante (600 rpm). La placa se lavó 3 veces, y luego 15 µL / pozo de 1x MSD de lectura se añadió tampón T y la placa se desarrolló usando un Imager Sector 6000 (Meso Escala Discovery). Los datos se transfirieron a Microsoft Excel para el análisis y se representaron usando GraphPad Prism v6. Estos experimentos mostraron que todos los anticuerpos de la invención ensayados en este ensayo se unen a largo plazo a ANGPTL4 humana y el dominio N-terminal de ANGPTL4 humana, y no se unen a largo plazo a ANGPTL3 humano. Un anticuerpo de referencia-ANGPTL3 específico se utilizó como control positivo para el ensayo de unión a ANGPTL3 (Figura 2).

Ejemplo 10: determinación de las constantes de disociación de anticuerpos por el ensayo de Titulación la solución en equilibrio (SET)

Los ensayos SET se realizaron como se indica a continuación. En una placa de polipropileno de 96 pozos, una concentración constante de anticuerpo ANGPTL4

(22:00) se mezcló con diferentes concentraciones proteína ANPGLT4 de longitud completa no biotinilada de humano, cyno, ratón, rata o dominio N-terminal de la proteína ANGPTL4 humana (5 veces la dilución en serie que van desde 24:01 a 100 nM) en tampón SET (PBS, pH 7,4 sin $CaCl_2$ o $MgCl_2$, 0,5% w/v de albúmina de suero bovino (ácidos grasos libres) y 0,02% v / v de Tween-20). El volumen de reacción final fue de 80 µL. Se selló la placa utilizando una película adhesiva y se incubó a 22 °C durante 14 horas con agitación constante (300 rpm). Durante el mismo período de tiempo, un Meso Escala de Discovery (MSD) placa recubierta con estreptavidina de 384 pozos fue bloqueado por la incubación de la placa con 50 µL de tampón de bloqueo (PBS, pH 7,4, 5% w/v albúmina de suero bovino) por pozo a 4 °C. La placa MSD bloqueada se lavó 3 veces con tampón de lavado (PBS, pH 7,4 y 0,05% v / v de Tween-20) usando un lavador de placas (BioTek). ANGPTL4 biotinilado (ANGPTL4de longitud completa humana, de cyno, de ratón o rata o el dominio N-terminal de ANGPTL4 humana) proteína (1 nM, 15 µL por pocillo) se inmovilizó sobre la superficie de la placa MSD recubierta con estreptavidina por incubación a 22 °C durante una hora con agitación constante (600 rpm). A continuación, la placa se lavó 3 veces como se describió anteriormente.

Las reacciones de unión de equilibrio (15 µL por pozo) se aplicaron a la placa MSD con ANGPTL4 inmovilizado y se incubaron durante 20 min a 22 °C. El material no unido se eliminó lavando la placa 3 veces con tampón de lavado, y el anticuerpo capturado se detectó mediante la adición de 15 µL por pozo de una dilución 1: 500 marcado con sulfo anti-IgG humana de cabra (Meso Escala Discovery). La placa se incubó durante una hora con agitación constante (600 rpm). La placa se lavó 3 veces, y luego 15 µL / pozo de 1x MSD de lectura se añadió tampón T y la placa se desarrolló usando un Imager Sector 6000 (Meso Escala Discovery). Los datos se transfirieron a Microsoft Excel para el análisis y se representaron usando GraphPad Prism v6. Los valores de Kd se determinaron ajustando los datos a la ecuación siguiente:

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 ANGPTL4 presente en solución, cabina es la concentración constante de anticuerpo ANGPTL4 en solución, CAg es la concentración de ANGPTL4 en solución, y K_D es la constante de equilibrio de disociación. Las constantes de equilibrio de disociación determinadas utilizando este método se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Constantes de disociación (Kd) para anticuerpos de la invención que se unen a proteínas ANGPTL4 determinadas ensayos de Valoración por solución en equilibrio (SET)

Anticuerpo (IgG)	ANGPTL4 humana (26 a 406) KD (pM)	ANGPTL4 de Cyno (26-406) KD (pM)	ANGPTL4 de Rata (24-405) KD (pM)	ANGPTL4 de Ratón (26-410) KD (pM)
NEG276	24	14	> 500 *	> 500 *
NEG276-LALA	8	7	> 500 *	> 500 *
NEG278	15	20	> 500 *	> 500 *
NEG310	21	22	> 500 *	> 500 *
NEG313	9	15	> 500 *	> 500 *
NEG315	12	21	> 500 *	> 500 *
NEG318	9	17	> 500 *	> 500 *
NEG319	16	8	> 500 *	> 500 *
Ref Ab *	17	4	517	194

*No se detectó señal de unión con las condiciones experimentales utilizadas, lo que indica un valor KD> 500 pM. Un valor KD de 517 pM se determinó por la unión de un anticuerpo ANGPTL4de referencia a la ANGPTL4 de rata.

Ejemplo 11: cinética de unión de anticuerpos y constantes disociación determinadas por Ensayo de unión cinética Octet

Las constantes de disociación (K_D) Se determinaron para los anticuerpos seleccionados de la invención mediante el uso de un octeto (ForteBio) ensayo de cinética de unión. ForteBio 10X Kinetics Buffer (ForteBio, número de catálogo 18-5032) se diluyó 10 veces con DPBS (Life Technologies, número de catálogo 14190-136), y se añadió la solución resultante (0,2 ml por pocillo) a una placa de 96 pozos

(Greiner, número de catálogo 65520). Sensores de estreptavidina (ForteBio, número de catálogo 18-5020) se sumergieron en la solución y se equilibraron durante al menos 10 min a temperatura ambiente. En una segunda placa de 96 pozos (Greiner, número de catálogo 65520), los sensores se lavaron en tampón 1X Kinetics, y luego se sumergieron en 200 ul de ANGPTL4 25 nM humana biotinilada o una proteína de referencia biotinilado (por sustracción del fondo) para 1,000 seg a segundo a temperatura ambiente. Los sensores se lavaron a continuación en tampón 1X Kinetics para 120 seg, y se sumergieron en 200 ul de anticuerpo ANGPTL4 diluido en tampón 1X Kinetics a diversas concentraciones (diluciones en serie de 2 veces; las concentraciones más altas fueron 12,5 nM o 25 nM; las concentraciones más bajas oscilaron 0,8-3,1 nM; se utilizaron 4-6 concentraciones de anticuerpos diferentes para cada determinación KD), y la asociación de anticuerpos se monitorizó durante 480 segundos. Los sensores se transfirieron entonces a un 200 ul de tampón 1X Kinetics pozo que contiene, y la disociación del anticuerpo se controló durante 1200 segundos. Asociación y disociación de curvas del fondo con corrección fueron equipados a nivel mundial por Software Octeto (ForteBio) para generar la asociación (ka) y disociación (kd) constantes de velocidad, que a su vez se utilizaron para calcular las constantes de disociación de equilibrio (KD). Los datos resultantes para los anticuerpos seleccionados de la invención se muestra en la Tabla 7 y la Tabla 8.

Tabla 7. constantes de disociación (Kd) de anticuerpos ANGPTL4 humano (26 a 406) determinados por ensayo de unión cinética ForteBio

Anticuerpo	ANGPTL4 humana (26 a 406)		
	ka (M-1s-1)	kd (s-1)	KD (pM)
NEG276	3,4 x 105	8,0 x 10-6	23
NEG278	3,0 x 105	6,7 x 10-7	≤17 *
NEG310	2,2 x 105	1,1 x 10-5	25
NEG313	2,8 x 105	1,1 x 10-5	40
NEG315	2,8 x 105	7,9 x 10-6	29
NEG318	2,7 x 105	1,2 x 10-5	45
NEG319	2,8 x 105	1,0 x 10-5	36

*Límite superior reportado porque la tasa de disociación es más lenta que el límite de detección, que es de aproximadamente 5 x 10^{-6} s^{-1}.

Tabla 8. constantes de disociación (K_D) de NEG276-LALA determinados por ensayos cinéticos de unión ForteBio

Anticuerpo	Proteína ANGPTL4	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	K_D (pM)	K_D media (PM)
NEG276-LALA	ANGPTL4 humana (26 a 406)	4,1 x 105	5,9 x 10-6	14	13
		3,6 x 105	6,0 x 10-6	17	
		4,3 x 105	4,9 x 10-7	≤12 *	
		6,8 x 105	7,0 x 10-6	10	
	ANGPTL4 de Cyno (26-406)	3,6 x 105	5,4 x 10-6	15	15
		3,7 x 105	4,1 x 10-6	≤14 *	
	ANGPTL4 de Rata (24-405)	1,6 x 105	1,2 x 10-3	7470	6343
		1,7 x 105	1,1 x 10-3	6030	
		5,2 x 104	2,8 x 10-5	5530	
	ANGPTL4 de Ratón (26-410)	3,6 x 105	2,9 x 10-3	8250	6200
		4,3 x 105	1,8 x 10-3	4150	

	ANGPTL4 humana (26 a 161)	2,2 x 105	3,1 x 10-6	≤23 *	38
		1,8 x 105	9,2 x 10-6	52	
	ANGPTL4 de Cyno (26-161)	2,7 x 105	6,4 x 10-6	24	56
		1,9 x 105	1,7 x 10-5	87	
	ANGPTL3 Humana (17-460)	- *	- *	> 6000 **	> 6000 **
		- *	- *	> 6000 **	

*****Informó límite superior debido a que la tasa de disociación es más lento que el límite de detección, que es de aproximadamente 5 x 10^{-6} s^{-1}. ** No vinculante se detectó en la mayor concentración de anticuerpos probados, 25 nM.

Ejemplo 12: mapeo de epítopos por espectrometría de masas / intercambio hidrógeno-deuterio

Intercambio de hidrógeno-deuterio (HDx) en combinación con espectrometría de masas (MS) (Woods, 2001) se utilizó para mapear el sitio de unión de anticuerpos NEG276 y NEG318 en el dominio ANGPTL4 N-terminal. En HDx, los hidrógenos amida intercambiables de las proteínas son sustituidos por deuterio. Este proceso es sensible a la estructura/ dinámica de la proteína y accesibilidad de disolvente y, por lo tanto, capaz de informar sobre la unión del ligando. El objetivo de estos experimentos fue la identificación de los epítopos de NEG276 y NEG318 en ANGPTL4.

Se realizaron Experimentos Automatizados HDx / MS utilizando métodos similares a los descritos en la literatura (Chalmers, 2006). Los experimentos se realizaron en una plataforma Waters HDx-MS, que incluye un inyector automático LEAP, nanoACQUITY Sistema UPLC, y SYNAPT G2 espectrómetro de masas. El tampón de deuterio utilizado para etiquetar el esqueleto de la proteína con deuterio era 50 mM D-Tris-HCl (pH 7,4), NaCl 500 mM, glicerol al 15%, y β-D-maltósido 0,1% de n-octilo; el porcentaje global de deuterio en la solución era 82,5%. Para ANGPTL4

humana (26 a 161) experimentos de marcaje de deuterio en la ausencia de anticuerpo ANGPTL4, 300 pmol de ANGPLT4 humano (26-161) (1,3 l) se diluyó usando 100 l de la memoria intermedia de deuterio en un tubo refrigerado y se incubaron durante 25 minutos en un rotador a 4 °C. A continuación, la reacción de marcaje se inactivó con 100 µl de tampón de enfriamiento refrigerados en hielo durante tres minutos. Después de tres minutos, la solución inactivada se inyectó en el sistema de LC-MS para la digestión pepsina automatizada y el análisis de péptidos. Para ANGPTL4 humana (26 a 161) experimentos de marcaje de deuterio en la presencia de anticuerpo unido ANGPTL4, 300 pmol del anticuerpo ANGPTL4 se inmovilizó primero en Thermo perlas de Proteína G Plus y reticula usando suberato de disuccinimidilo (DSS). Para realizar los experimentos de marcaje, las perlas de anticuerpo (que contienen 300 pmol anticuerpo) se incubaron con 300 pmol ANGPTL4 humana (26 a 161) durante 30 minutos a 4 °C. Después de 30 minutos las perlas se lavaron con 200 l de tampón Tris. Luego se añadieron 200 µl de tampón de deuterio refrigerada y el complejo se incubó durante 25 minutos a 4 °C. Después de 25 minutos, la reacción de marcaje se paró con 125 µl de tampón de enfriamiento refrigerados en hielo durante 2,5 minutos. Después de girar la muestra durante 30 segundos en una centrífuga, la solución inactivada se inyectó en el sistema de LC-MS para la digestión pepsina automatizada y el análisis de péptidos.

Todas las mediciones se llevaron a cabo utilizando un mínimo de tres triplicados analíticos. Todos los experimentos de intercambio de deuterio se inactivaron usando 0,5 M TCEP y urea 3 M (pH = 2,5). Después de enfriamiento, el antígeno intercambiado se sometió a en línea digestión con pepsina usando una columna Poroszyme Immobilized pepsina (2,1 x 30 mm) a 12 °C seguido por la captura en una columna Waters atrapando Vanguard HSS T3. Los péptidos se eluyeron de la columna de la captura y separaron en una columna Waters C18 CSH 1 x 100 mm (mantenida a 1 °C) a un caudal de 40 µl / min utilizando un gradiente binario de ocho minutos de 2 a 35% de B (fase móvil A era 99,9% de agua y ácido fórmico al 0,1%; fase móvil B era 99,9% de acetonitrilo y ácido fórmico al 0,1%).

En estos experimentos de intercambio de deuterio, se detectaron péptidos que cubren el 87% de la secuencia del dominio ANGPTL4 N-terminal. Los péptidos detectados, y la reducción en la incorporación de deuterio para cada péptido, se indican en la Tabla 9. El experimento de mapeo HDxMS identificó tres regiones del

dominio N-terminal de ANGPTL4 que fueron significativamente protegida por tanto NEG276 y NEG318: aminoácidos 26-35 (G26PVQSKSPRF35) (SEQ ID NO: 165), aminoácidos 42 a 68 (N42VLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSA68) (SEQ ID NO: 174) y aminoácidos 69-95 (L69ERRLSACGSACQTEGSTDLPLAPES95) (SEQ ID NO: 190). La observación de que NEG276 y NEG318 protegen múltiples regiones del dominio ANGPTL4 N-terminal de la incorporación de deuterio es consistente con los resultados de mapeo de epítopos péptido lineal que sugieren que NEG276 y NEG318 tienen conformacional en lugar de epítopos lineales (véase el Ejemplo 13).

Tabla 9: Efecto de NEG276 y NEG318 vinculante sobre la incorporación de deuterio en ANGPLT4 humana (26-161). Para cada péptido detectado por espectrometría de masas, se muestra la reducción en la incorporación de deuterio (en Daltons) para el complejo anticuerpo / ANGPTL4 en relación con ANGPTL4 sola.

Nombre de los Péptidos	Secuencia	SEQ ID NO	Reducción en la incorporación de deuterio (Daltons)	
			NEG276	NEG318
26-35	GPVQSKSPRF	165	1.1	1.2
28-38	VQSKSPRFASW	166	1.0	0.9
42-49	NVLAHGLL	167	<0,5	<0,5
42-51	NVLAHGLLQL	168	<0,5	<0,5
44-51	LAHGLLQL	169	<0,5	<0,5
42-54	NVLAHGLLQLGQG	170	0.8	0.8

42-55	NVLAHGLLQLGQGL	171	0.9	0.8
42-57	NVLAHGLLQLGQGLRE	172	0.9	0.9
42-66	NVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQL	173	1.2	16
42-68	NVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQL SA	174	1.3	1.8
44-66	LAHGLLQLGQGLREHAERTRSQL	175	1.1	16
45-57	AHGLLQLGQGLRE	176	0.7	0.9
45-66	AHGLLQLGQGLREHAERTRSQL	177	1.0	15
49-66	LQLGQGLREHAERTRSQL	178	0.5	1.0
52-66	GQGLREHAERTRSQL	179	<0,5	0.9
69-102	LERRLSACGSACQTEGSTDLPAPES RVDPEVL	180	1.4	1.9
76-102	CGSACQTEGSTDLPAPESRVDPEVL	181	1.0	1.2
86-102	STDLPAPESRVDPEVL	182	1.1	1.1
96-102	RVDPEVL	183	<0,5	<0,5
103-109	HSLQTQL	184	0.5	0.5

110-119	KAQNSRIQQL	185	<0,5	<0,5
110-135	KAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHL	186	<0,5	<0,5
120-135	FHKVAQQQRHLEKQHL	187	<0,5	<0,5
141-147	QSQFGLL	188	0.6	0.6
144-155	FGLLDHKHLDHE	189	<0,5	<0,5

Ejemplo 13: Mapeo de epítopes por unión de péptido lineal

La capacidad de los anticuerpos seleccionados de la invención, a saber, NEG276 y NEG318, para unirse a los péptidos 15-amino-ácido lineales derivados de la bobina en espiral dominio N-terminal de ANGPTL4 humana fue probada. Un total de 43 péptidos se sintetizaron y se purificó utilizando métodos estándar; la secuencia de los péptidos se muestran en la Tabla 10. Los péptidos se inmovilizaron sobre una superficie de vidrio, y la capacidad de NEG276 y NEG318 para unirse a los péptidos inmovilizados se evaluó usando métodos experimentales optimizadas para el mapeo de epítope péptido lineal en JPT Péptido Technologies (Berlin , Alemania). Un anticuerpo que no se une a ANGPTL4 se utilizó como control para la unión no específica. No se observó unión de NEG276 o NEG318 a cualquiera de los péptidos 43 15-mer específico en estos experimentos. Estos resultados sugieren fuertemente que los epítopos de NEG276 y NEG318 no son péptidos lineales ANGPTL4, sino que son epítopos conformacionales.

Tabla 10. Secuencias de péptidos lineales derivadas de ANGPTL4 utilizados para experimentos de unión de péptidos.

Péptidos	Nombre (SEQ ID	Péptidos	Nombre (SEQ

	NO.)		ID NO.)
GPVQSKSPRFASWDE	P1 (191)	APESRVDPEVLHSLQ	P23 (213)
QSKSPRFASWDEMNV	P2 (192)	SRVDPEVLHSLQTQL	P24 (214)
SPRFASWDEMNVLAH	P3 (193)	DPEVLHSLQTQLKAQ	P25 (215)
FASWDEMNVLAHGLL	P4 (194)	VLHSLQTQLKAQNSR	P26 (216)
WDEMNVLAHGLLQLG	P5 (195)	SLQTQLKAQNSRIQQ	P27 (217)
MNVLAHGLLQLGQGL	P6 (196)	TQLKAQNSRIQQLFH	P28 (218)
LAHGLLQLGQGLREH	P7 (197)	KAQNSRIQQLFHKVA	P29 (219)
GLLQLGQGLREHAER	P8 (198)	NSRIQQLFHKVAQQQ	P30 (220)
QLGQGLREHAERTRS	P9 (199)	IQQLFHKVAQQQRHL	P31 (221)
QGLREHAERTRSQLS	P10 (200)	LFHKVAQQQRHLEKQ	P32 (222)
REHAERTRSQLSALE	P11 (201)	KVAQQQRHLEKQHLR	P33 (223)
AERTRSQLSALERRL	P12 (202)	QQQRHLEKQHLRIQH	P34 (224)
TRSQLSALERRLSAS	P13 (203)	RHLEKQHLRIQHLQS	P35 (225)
QLSALERRLSASGSA	P14 (204)	EKQHLRIQHLQSQFG	P36 (226)

ALERRLSASGSASQG	P15 (205)	HLRIQHLQSQFGLLD	P37 (227)
RRLSASGSASQGTEG	P16 (206)	IQHLQSQFGLLDHKH	P38 (228)
SASGSASQGTEGSTD	P17 (207)	LQSQFGLLDHKHLDH	P39 (229)
GSASQGTEGSTDLPL	P18 (208)	QFGLLDHKHLDHEVA	P40 (230)
SQGTEGSTDLPLAPE	P19 (209)	LLDHKHLDHEVAKPA	P41 (231)
TEGSTDLPLAPESRV	P20 (210)	HKHLDHEVAKPARRK	P42 (232)
STDLPLAPESRVDPE	P21 (211)	KHLDHEVAKPARRKR	P43 (233)
LPLAPESRVDPEVLH	P22 (212)		

Ejemplo 14: Efecto de los anticuerpos ANGPTL4 de la invención sobre las concentraciones de triglicéridos en plasma en ratones transgénicos de ANGPTL4 humana

Un constructo para expresar ANGPTL4 humano transgénico en ratones se realizó mediante la inserción de la secuencia de ADNc ANGPTL4 humana de longitud completa en la región de polienlazador del vector pLIVLE6, que contiene el promotor del gen de la apolipoproteína E humana y su región de control hepática. Ratones transgénicos ANGPTL4 se generaron en un C57BL / 6J antecedentes y criados en Novartis (East Hanover, NJ). Los ratones transgénicos se cortaron cola a los 7 días de edad y se extrajo ADN de las colas usando un Kit de tejido REDExtract-N-Amp PCR (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO; cat # XNATR). El transgén ANGPTL4 humana se detectó mediante el uso de pares de cebadores dirigidos al vector pLIVLE6 y la orientación de ADNc de ANGPTL4. Los animales fueron alojados en jaulas de fondo sólido en un bastidor equipado para proporcionar automáticamente agua a voluntad,

mantuvieron en un 12 horas de luz / oscuridad ciclo (06 a.m.-6 p.m.), y se les da comida para roedores estándar (Harlan-Teklad; Frederick, MD; cat # 8604). El vivero se mantuvo entre 68 a 76 °C con 30 a 70% de humedad. Los ratones se alojaron con compañeros de camada y recibieron alimento y agua ad libitum durante el estudio, excepto por 4 hr de ayuno antes de la recogida de muestras.

Los animales se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y se anestesiaron brevemente para la recogida de sangre submandibular para medir las concentraciones de triglicéridos en plasma de línea de base. Los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal (ip) con 30 mg / kg de anticuerpo diluido en PBS (10 ml volumen de inyección / kg). La sangre se recogió después de 4 ayunos hr en los días 1, 2 y 5 después de la dosis para medir triglicéridos en plasma y las concentraciones totales de IgG humana. La sangre se recogió en tubos BD Microtainer colección / separador con EDTA (Becton, Dickinson y Compañía; Franklin Lakes, Nueva Jersey, número de catálogo 365973). Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 20.817 xg, y el plasma se transfirió a un tubo de 0,2 ml Thermo-tira (Thermo-Científico; Pittsburg, PA; cat # AB 0451) y congelados y almacenados a -80 °C.

Las concentraciones de triglicéridos en plasma se midieron utilizando el conjunto de triglicéridos (GPO) Reactivo Líquido (Pointe Scientific, Canton, MI, número de catálogo T7532-500). En pocas palabras, 300 µl de reactivo de ensayo, pre-calentado a 37 ° C, se añaden a 5 l de plasma en una placa clara, de fondo plano de 96 pocillos (Thermo Scientific, número de catálogo 269620). La placa se mezcló en un agitador de placas durante 30 seg y luego se coloca en una incubadora a 37ºC durante 5 min. Después de una mezcla 20 seg, la absorbancia a 500 nm se midió utilizando un lector de placas Molecular Devices SPECTRAmax PLUS. Las concentraciones de triglicéridos se calcularon utilizando una curva de calibración generada usando cantidades conocidas de un estándar de triglicéridos (Pointe Scientific, número de catálogo T7531-STD).

Los anticuerpos NEG276 y NEG318 redujeron los niveles de triglicéridos en plasma cuando se administran a ratones ANGPTL4 transgénicos (Figura 3).

Ejemplo 15: Efectos de la administración de uno de los anticuerpos ANGPTL4 de la invención, a, monos cynomolgus hipertrigliceridémicos diabéticos obesos

Para evaluar el perfil farmacocinético y efectos farmacológicos de NEG276-LALA, se administró una sola, subcutánea, 3 mg/kg dosis a cuatro monos cynomolgus hipertrigliceridemia. Los monos utilizados en este estudio tenían niveles de triglicéridos en plasma de línea de base que van desde 207 mg / dl a 2438 mg / dL. En varios puntos de tiempo más de 5 semanas después de NEG276-LALA la dosificación, se recogieron muestras de plasma (muestras de sangre se extrajeron de los animales antes de la alimentación de la mañana, pero los animales no se mantuvieron en ayunas durante la noche).

Las concentraciones plasmáticas NEG276-LALA totales se determinaron por métodos estándar. NEG276-LALA alcanzó una concentración media máxima en plasma (Cmax) de 15.536 ± 2.281 ng / ml a los 3 días después de la dosis. En el día 21 después de la dosis, la concentración media de plasma NEG276-LALA era de 2663 ng / ml (Figura 4).

Plasma TG, colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL), el total de la apolipoproteína B (apoB) y apolipoproteína CIII se determinaron las concentraciones (apoCIII) usando kits de ensayo disponibles comercialmente (TG: triglicéridos (GPO) conjunto de reactivos líquidos, Pointe Científico, número de catálogo T7532-500; colesterol total: Colesterol Reactivo Set, Pointe Scientific, número de catálogo C7510-500; HDL: Colesterol Reactivo precipitante del kit de reactivos HDL manual, Wako, número de catálogo 431-52501; ApoB en total: K-Ensayo Apo B, Kamiya Biomedical Company, número de catálogo de KAI-004; apoC-III: apoC-III reactivo de ensayo, Randox, número de catálogo LP-3865).

La administración de NEG276-LALA resultó en una marcada disminución en los niveles de triglicéridos en plasma (TG). Plasmática máxima TG descenso se observó en el día 7 después de la dosificación; en este punto en el tiempo en plasma las concentraciones de TG fueron 58% más bajos que los niveles plasmáticos de TG basales. Después de pico TG bajar ocurrió el día después de la dosis 7, las concentraciones de TG plasmáticos permanecieron reprimidas por mayor del 40% con respecto a las concentraciones de referencia a través de 21 días después de la dosis,

y luego regresó a la línea base (Figura 5). Además de su efecto en plasma TG, la administración NEG276-LALA redujo las concentraciones de colesterol total en plasma en aproximadamente un 30% respecto al valor basal (Figura 6) y el aumento de las concentraciones de colesterol de HDL en más de un 20% del valor basal en los días 7 a 21 después de la dosificación (la Figura 7). Además, se observó una disminución de aproximadamente 30% en el total de las concentraciones plasmáticas de apoB en los días 7 a 21 después de la dosis (Figura 8), y una disminución de aproximadamente 25% en las concentraciones plasmáticas apoC-III en relación con la línea de base se observó en los días 7 al 21 (Figura 9). También se evaluó el efecto de la administración NEG276-LALA en los niveles de triglicéridos y de colesterol de lipoproteínas asociadas mediante la separación de los componentes de lipoproteínas utilizando métodos estándar de cromatografía de exclusión por tamaño. Comparación de los datos de perfiles de lipoproteínas para pre-dosis (día 0) y 7 días muestras después de la dosis mostró que la administración NEG276-LALA resultó en disminuciones marcadas en ricas en triglicéridos de lipoproteínas (TRL) colesterol asociado y las concentraciones de triglicéridos (resultados de un mono se muestran en la Figura 10 y la Figura 11).

Incorporación por referencia

Todas las referencias citadas en el presente documento, incluyendo patentes, solicitudes de patente, documentos, libros de texto, y similares, y las referencias allí citadas, en la medida que no son ya, se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Equivalentes

La especificación escrita anterior se considera que es suficiente para permitir a un experto en la técnica poner en práctica la invención. La descripción anterior y los ejemplos detalle ciertas realizaciones preferidas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Se apreciará, sin embargo, que no importa lo detallado puede aparecer lo anterior 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.

Reclamaciones:

1. Un anticuerpo aislado anti-ANGPTL4 o fragmento del mismo.

2. Un anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior aislado, en donde dicho anticuerpo o fragmento de bloquea la unión de LPL a la proteína ANGPTL4.

3. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a una proteína de ANGPTL4 humana con una K_D menor o igual a 45 pM, como se mide por ensayos de unión cinéticos ForteBio, o menor o igual a 24 pM, medida por un ensayo de titulación de solución en equilibrio (SET).

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

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

6. Un aislado anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde dicho anticuerpo o fragmento comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de la Tabla 1, en donde la variante tiene al menos de uno a cuatro cambios de aminoácidos en una de CDR1, CDR2, o CDR3.

7. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a ANGPTL4 humana, donde el anticuerpo o fragmento comprende una CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 34, 54, 74, 94, 114, y 134.

8. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a ANGPTL4 humana, donde el anticuerpo o fragmento comprende una VH seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118, y 138; y una VL

seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128, y 148 o una secuencia de aminoácidos con 97-99% de identidad de los mismos.

9. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118, y 138.

10. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128, y 148.

11. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 38, 58, 78, 98, 118, y 138; y la secuencia de dominio variable de cadena ligera seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 23, 48, 68, 88, 108, 128, y 148.

12. Un anticuerpo o fragmento aislado del mismo, que comprende una cadena pesada de la región variable de CDR1 seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 7, 32, 52, 72, 92, 112, y 132; CDR2 seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 33, 53, 73, 93, 113, y 133; CDR3 selecciona da del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 9, 34, 54, 74, 94, 114, y 134; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17, 42, 62, 82, 102, 122, y 142; CDR2 seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 18, 43, 63, 83, 103, 123, y 143; y CDR3 seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 19, 44, 64, 84, 104, 124, y 144.

13. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable CDR1 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 35, 55, 75, 95, 115, y 135; CDR2 seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, 36, 56, 76, 96, 116, y 136; CDR3 seleccionada entre el grupo que consta de 12, 37, 57, 77, 97, 117, y 137; una región variable CDR1 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, 45, 65, 85, 105, 125, y 145; CDR2 seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, 46, 66, 86, 106,

126, y 146; y CDR3 seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 22, 47, 67, 87, 107, 127, y 147.

14. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 7; CDR2 de la SEC ID NO: 8; CDR3 de SEQ ID NO: 9; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 17; CDR2 de la SEC ID NO: 18; y CDR3 de SEQ ID NO: 19.

15. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable de CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 32; CDR2 de la SEC ID NO: 33; CDR3 de SEQ ID NO: 34; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 42; CDR2 de la SEC ID NO: 43; y CDR3 de SEQ ID NO: 44.

16. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable de CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 52; CDR2 de la SEC ID NO: 53; CDR3 de SEQ ID NO: 54; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 62; CDR2 de la SEC ID NO: 63; y CDR3 de SEQ ID NO: 64.

17. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 72; CDR2 de la SEC ID NO: 73; CDR3 de SEQ ID NO: 74; una la región variable CDR1 de la cadena ligera de SEC ID NO: 82; CDR2 de la SEC ID NO: 83; y CDR3 de SEQ ID NO: 84.

18. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable de CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 92; CDR2 de la SEC ID NO: 93; CDR3 de SEQ ID NO: 94; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 102; CDR2 de la SEC ID NO: 103; y CDR3 de SEQ ID NO: 104.

19. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable de CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 112; CDR2 de la SEC ID NO: 113; CDR3 de SEQ ID NO: 114; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 122; CDR2 de la SEC ID NO: 123; y CDR3 de SEQ ID NO: 124.

20. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable de CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 132; CDR2 de la SEC ID

NO: 133; CDR3 de SEQ ID NO: 134; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 142; CDR2 de la SEC ID NO: 143; y CDR3 de SEQ ID NO: 144.

21. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable de CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 10; CDR2 de la SEC ID NO: 11; CDR3 de SEQ ID NO: 12; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 20; CDR2 de la SEC ID NO: 21; y CDR3 de SEQ ID NO: 22.

22. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable de CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 35; CDR2 de la SEC ID NO: 36; CDR3 de SEQ ID NO: 37; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 45; CDR2 de la SEC ID NO: 46; y CDR3 de SEQ ID NO: 47.

23. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable de CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 55; CDR2 de la SEC ID NO: 56; CDR3 de SEQ ID NO: 57; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 65; CDR2 de la SEC ID NO: 66; y CDR3 de SEQ ID NO: 67.

24. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable de CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 75; CDR2 de la SEC ID NO: 76; CDR3 de SEQ ID NO: 77; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 85; CDR2 de la SEC ID NO: 86; y CDR3 de SEQ ID NO: 87.

25. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable de CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 95; CDR2 de la SEC ID NO: 96; CDR3 de SEQ ID NO: 97; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 105; CDR2 de la SEC ID NO: 106; y CDR3 de SEQ ID NO: 107.

26. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable de CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 115; CDR2 de la SEC ID NO: 116; CDR3 de SEQ ID NO: 117; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 125; CDR2 de la SEC ID NO: 126; y CDR3 de SEQ ID NO: 127.

27. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que comprende una región variable de CDR1 de la cadena pesada de la SEC ID NO: 135; CDR2 de la SEC ID

NO: 136; CDR3 de SEQ ID NO: 137; una región variable CDR1 de la cadena ligera de la SEC ID NO: 145; CDR2 de la SEC ID NO: 146; y CDR3 de SEQ ID NO: 147.

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

29. Un método de tratamiento de un trastorno-ANGPTL4 que comprende administrar a un paciente aquejado de un trastorno-ANGPTL4 una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.

30. El método de la reivindicación 29, en el que el paciente está afectado por uno o más de hipertrigliceridemia grave (por ejemplo, con la concentración de triglicéridos en plasma> 500 mg/dL), hipertrigliceridemia asociada con la obesidad, hipertrigliceridemia tipo V y quilomicronemia.

31. El método de la reivindicación 29, en el que el paciente está afectado por uno o más de dislipidemia primaria, síndrome metabólico, y la diabetes tipo 2.

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

33. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a una proteína de ANGPTL4 humana y transversalmente compite con un anticuerpo aislado o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.

Resumen

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen a la proteína similar a angiopoyetina-4 humano (en adelante, referida a veces como "ANGPTL4"), y composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento que comprenden a la misma.