

“PROTEÍNAS DE UNIÓN ESPECÍFICAS PARA LOX1 Y SUS USOS”REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 62/058 254, presentada el 1 de octubre de 2014, que se incorpora a modo de referencia en este documento en su totalidad.

REFERENCIA A LA LISTA DE SECUENCIAS PRESENTADA POR VÍA ELECTRÓNICA

El contenido de la lista de secuencias presentada por vía electrónica en el archivo de texto ASCII (nombre: LOX1-100W01_SequenceListing_ascii.txt; tamaño: 50 926 bytes; y fecha de creación: 30 de septiembre de 2015) presentado con la solicitud se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

Esta divulgación proporciona proteínas de unión al receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas de tipo lectina (LOX1, por sus siglas en inglés) y métodos para el uso de tales proteínas de unión, por ejemplo, para el tratamiento, prevención y/o mejora de una enfermedad o afección asociada con LOX1 incluidas, por ejemplo, la disfunción vascular, aterosclerosis (evolución de las placas, ruptura y/o trombosis), arteriopatía coronaria (CAD, por sus siglas en inglés), isquemia (por ejemplo, isquemia de miocardio), infarto (por ejemplo, infarto de miocardio), accidente cerebrovascular y síndrome coronario agudo (ACS, por sus siglas en inglés).

La aterosclerosis es una enfermedad compleja resultado de la acumulación de lípidos, macrófagos y elementos fibrosos como lesiones en la pared arterial. Las lesiones se convierten en placas complejas que reducen la luz arterial

y son un foco de inflamación crónica. Las placas son susceptibles de sufrir una ruptura que desencadena la trombosis la cual da como resultado eventos cardiovasculares adversos, incluidos accidente cerebrovascular e infarto de miocardio. La aterosclerosis es la causa principal de arteriopatía coronaria, accidente cerebrovascular y enfermedad vascular periférica, y por lo tanto, representa la causa más común de morbilidad en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2011).

El receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas de tipo lectina (LOX-1) es una proteína transmembranaria de tipo II con uniones de tipo disulfuro. Se identificó en primer lugar como un receptor principal de las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) (Kume *et al.*, 70.^a Sesiones Científicas de American Heart Association Ser. 96, 1997). El receptor está constituido por un dominio citoplasmático N-terminal corto, un dominio transmembranario, un dominio cuello y un dominio de lectina de tipo C (CTLD, por sus siglas en inglés), en el que se ha resuelto la estructura del CTLD (Ohki *et al.*, *Structure* 13:905-917 (2005)). Además, se puede escindir proteolíticamente LOX1 en el dominio cuello y liberar LOX1 soluble (sLOX1). LOX1 es un receptor depurador de la clase E y se une a múltiples ligandos incluidos oxLDL, proteína C-reactiva (CRP, por sus siglas en inglés), fosfatidilserina, productos finales de la glucación avanzada (AGE, por sus siglas en inglés), lipoproteínas densas pequeñas (sdLDL), HDL oxidada, N4-oxononaoíl-lisina (ONL), proteínas de choque térmico (hsp, por sus siglas en inglés), *Chlamydia pneumoniae*, trombocitos, leucocitos y células apoptóticas. Muchos de estos ligandos, especialmente las oxLDL, se asocian con la aterosclerosis. Múltiples rutas de

la transducción de señales se asocian con la activación de LOX1 incluidas la RhoA/Rac1, monóxido de nitrógeno, p38MAPK, proteínas cinasas B y C, ERK1/2 y NFκB. Remítase, por ejemplo, a Taye *et. al.*, *Eur J Clin Invest.* 43(7):740-5 (2013).

Los hallazgos preclínicos indican la participación de LOX1 en el fomento de la disfunción vascular, la evolución de las placas, ruptura y trombosis, aterosclerosis y afecciones inflamatorias. Remítase a, por ejemplo, Ulrich-Merzenich *et al.*, *Expert Opin Ther Targets.* 17(8):905-19 (2013). Por ejemplo, mientras los ratones con LOX1 inactivado presentan una reducción de la aterosclerosis aórtica y una reducción del depósito de colágeno en la pared de los vasos (Mehta *et al.*, *Circ. Res.* 100:1634-1642 (2007)), la sobreexpresión de LOX1 incrementa la formación de placas ateroscleróticas (Inoue *et al.*, *Circ. Res.* 97:176-84 (2005); y White *et al.*, *Cardiovascular pathology* 20:369-73 (2011)) y se detecta la expresión de LOX1 en la región vulnerable de los hombros de las placas que se asocia con la acumulación de macrófagos, apoptosis y expresión de MMP-9 (Li *et al.*, *Cir. Cardio. Imaging* 3:464-72 (2010)). Con los anticuerpos neutralizantes contra LOX1 se restauró la dilatación arteriolar coronaria inducida por la acetilcolina (Xu *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27(4) 871-877 (2007)) y se redujo el engrosamiento de la íntima después de la lesión con globos en ratas (Hinagata *et al.*, *Cardiovasc. Res.* 69:263-71 (2006)). La expresión de LOX1 en los seres humanos no es constitutiva sino que es inducible de manera dinámica por los estímulos proinflamatorios. En la placa aterosclerótica se expresa LOX1 en las células endoteliales, células del músculo liso y macrófagos. Resulta interesante

que se haya propuesto el sLOX1 sérico como un elemento diagnóstico de la inestabilidad y la ruptura de las placas en pacientes con síndrome coronario agudo (ACS) (Nakamura *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51:158-163 (2010)); como un
5 elemento predictivo de la recaída o muerte debida a ACS (Kume *et al.*, 70.^a Sesiones Científicas de American Heart Association Ser. 96, 1997); y se asocie con un número creciente de lesiones complejas (Zhao *et al.*, *Clin. Cardiol.* 34:172-177 (2011)).

10 La mortalidad relacionada con la aterosclerosis sigue en aumento debido a la prevalencia creciente de la hipertensión, la diabetes, la dislipidemia y las características del estilo de vida (tales como el tabaquismo y la obesidad) que son factores de riesgo para la
15 aterosclerosis. Se ha observado un beneficio clínico significativo en la intervención con los tratamientos habituales que incluyen: inhibidores de trombocitosis, antihipertensores, inhibidores de la HMG-CoA-reductasa (estatinas), agentes trombolíticos, dilatadores arteriales
20 percutáneos, la cirugía de revascularización por derivación aortocoronaria o el injerto de prótesis intravasculares. Sin embargo, a pesar de la utilización de estrategias y tratamientos preventivos todavía hay un gran número de
25 pacientes que padecen eventos cardiovasculares secundarios adversos importantes (MACE, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, se siguen necesitando nuevas herramientas terapéuticas que se puedan utilizar solas o combinadas con el tratamiento habitual.

COMPENDIO BREVE

30 En la divulgación se proporcionan proteínas de unión a LOX1 y sus métodos de uso. En aspectos particulares, las

proteínas de unión a LOX1 divulgadas en la presente reducen, inhiben o bloquean la unión de LOX1 a uno o más de sus ligandos. En algunos aspectos, las proteínas de unión a LOX1 reducen, inhiben o bloquean la unión de LOX1 a lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL), proteína C-reactiva (CRP) y/o productos finales de glucación avanzada (AGE). En algunos aspectos, en la divulgación se proporcionan métodos para utilizar las proteínas de unión a LOX1 en el tratamiento, prevención y/o mejora de una enfermedad o afección asociada con la expresión de LOX1 y/o una reducción de la señalización mediada por HDL. En la divulgación también se proporcionan métodos para utilizar las proteínas de unión a LOX1 en el tratamiento, prevención y/o mejora del síndrome coronario agudo (ACS), infarto de miocardio (MI, por sus siglas en inglés) o arteriopatía coronaria (CAD) o una afección asociada con ACS, MI o CAD. En algunos aspectos, en la divulgación se proporcionan métodos para utilizar las proteínas de unión a LOX1 en el tratamiento, prevención y/o mejora de una enfermedad o afección seleccionada a partir del grupo que incluye, sin carácter limitante: aterosclerosis, trombosis, arteriopatía coronaria (CAD), isquemia (por ejemplo, isquemia de miocardio), infarto (por ejemplo, infarto de miocardio), síndrome coronario agudo (ACS), accidente cerebrovascular, lesión por reperfusión, reestenosis, enfermedad vascular periférica, hipertensión, insuficiencia cardíaca, inflamación, angiogénesis, preeclampsia y cáncer.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad (CDR): la CDR1 de la región variable de la cadena pesada (VH), CDR2-VH, CDR3-VH, y la CDR1 de la región

variable de la cadena ligera (VL), CDR2-VL y CDR3-VL, donde el conjunto de CDR es idéntico o tiene 18 o menos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18) sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos respecto a un conjunto de referencia de CDR en el que: (a) CDR1-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1; (b) CDR2-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5; (c) CDR3-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14; (d) CDR1-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30; (e) CDR2-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31; y (f) CDR3-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende un conjunto de seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR): la CDR1 de la región variable de la cadena pesada (VH), CDR2-VH, CDR3-VH, y la CDR1 de la región variable de la cadena ligera (VL), CDR2-VL y CDR3-VL, donde el conjunto de CDR es idéntico o tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos respecto a un conjunto de referencia de CDR en el que: (a) CDR1-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1; (b) CDR2-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2; (c) CDR3-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3; (d) CDR1-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30; (e) CDR2-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31; y (f) CDR3-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad (CDR): la CDR1 de la región variable de la

cadena pesada (VH), CDR2-VH, CDR3-VH, la CDR1 de la región variable de la cadena ligera (VL), CDR2-VL y CDR3-VL, donde el conjunto de CDR es idéntico o tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones, 5 deleciones y/o inserciones de aminoácidos respecto a un conjunto de referencia de CDR en el que: (a) CDR1-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:38; (b) CDR2-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:39; (c) CDR3-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:40; 10 (d) CDR1-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:55; (e) CDR2-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:56; y (f) CDR3-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:57.

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 15 comprende un conjunto de seis CDR: CDR1-VH, CDR2-VH, CDR3-VH, CDR1-VL, CDR2-VL y CDR3-VL donde: (a) CDR1-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1; (b) CDR2-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2; (c) CDR3-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3; (d) 20 CDR1-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30; (e) CDR2-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31; y (f) CDR3-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32.

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 25 comprende un conjunto de seis CDR: CDR1-VH, CDR2-VH, CDR3-VH, CDR1-VL, CDR2-VL y CDR3-VL donde: (a) CDR1-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:38; (b) CDR2-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:39; (c) CDR3-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44; 30 (d) CDR1-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:55; (e) CDR2-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la

SEQ ID NO:60; y (f) CDR3-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:61.

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende un conjunto de seis CDR: CDR1-VH, CDR2-VH, CDR3-VH, CDR1-VL, CDR2-VL y CDR3-VL donde: (a) CDR1-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:38; (b) CDR2-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:39; (c) CDR3-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:40; (d) CDR1-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:55; (e) CDR2-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:56; y (f) CDR3-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:57.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90, 95, 97, 98 o un 99% de identidad secuencial con la SEQ ID NO:4 y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90, 95, 97, 98 o un 99% de identidad secuencial con la SEQ ID NO:33.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una VH que tiene al menos un 90, 95, 97, 98 o un 99% de identidad secuencial con la SEQ ID NO:41 y/o una VL que tiene al menos un 90, 95, 97, 98 o un 99% de identidad secuencial con la SEQ ID NO:58.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90, 95, 97, 98 o un 99% de identidad secuencial con las SEQ ID NOs:4, 19-29, 41 o 48-54; y una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90, 95, 97, 98 o un 99% de identidad secuencial con las SEQ ID NOs:33, 36, 37, 58 o 65-70.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90, 95, 97, 98 o un 99% de identidad secuencial y una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90, 95, 97, 98 o un 99% de identidad secuencial con una VH y VL seleccionadas entre: (a) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:4 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:33; (b) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:29 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:33; (c) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:41 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:58; y (d) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:54 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:70.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena ligera (VL), donde la secuencia de VH es idéntica o tiene 15 o menos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15) sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos respecto a una secuencia de VH de referencia de la SEQ ID N0:4, 19-28 o 29, y donde la secuencia de VL es idéntica o tiene un total de 6 o menos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos respecto a la secuencia de VL de referencia de la SEQ ID N0:33, 36 o 37.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada a partir del grupo constituido por: una VH que comprende la SEQ ID N0:4, 19-29, 41 o 48-54; y una región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada a partir del

grupo constituido por una VL que comprende la SEQ ID N0:33, 36, 37, 58 o 65-70.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una
5 región variable de la cadena ligera (VL) seleccionadas a partir del grupo constituido por: (a) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:4 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:33; (b) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:29 y
10 una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:33; (c) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:41 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:58; y (d) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:54 y una VL que tiene la secuencia
15 de aminoácidos de la SEQ ID N0:70.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:4 y una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende
20 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:33.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada entre una VH que contiene una CDR1-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:1, una CDR2-VH
25 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:2, 5-12 o 13, y una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:3, 14-17 o 18; y una región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada entre una VL que contiene una CDR1-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ
30 ID N0:30, una CDR2-VL que tiene la secuencia de aminoácidos

de la SEQ ID N0:31, y una CDR3-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:32, 34 o 35.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una
5 región variable de la cadena ligera (VL), donde la secuencia de VH es idéntica o tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones, deleciones y/o inserciones respecto a una secuencia de VH de referencia de la SEQ ID N0:41, 48-53 o 54, y donde la secuencia de VL es
10 idéntica o tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos respecto a la secuencia de VL de referencia de la SEQ ID N0:58, 65-69 o 70.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1
15 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada entre una VH que contiene una CDR1-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:38, una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:39, 42 o 43, y una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de
20 la SEQ ID N0:40, 44-46 o 47; y una región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada entre una VL que contiene una CDR1-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:55 o 59, una CDR2-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:56 o 60, y una CDR3-VL que tiene
25 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:57, 61-63 o 64.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende un conjunto de CDR: CDR1-VH, CDR2-VH, CDR3-VH, CDR1-VL, CDR3-VL y CDR3-VL tal como se describen en la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5 (por ejemplo, un conjunto de CDRs de
30 Lox514, LX5140011, LX5140014, LX5140016, LX5140038, LX5140094, LX5140108, LX5140110, LX5140092, LX5140092_D,

LX5140093, LX5140093_D, Lox696, LX6960067_ngl1,
LX6960071_ngl1, LX6960073_ngl1, LX6960086_ngl1,
LX6960094_ngl1, LX6960101_ngl1, LX6960102_ngl1,
LX6960116_ngl1, LX6960073_gl o LX6960073_G82bs_gl).

5 En algunos aspectos adicionales, la proteína de unión
a LOX1 comprende una región variable de la cadena pesada
(VH) y una región variable de la cadena ligera (VL) tal como
se describen en la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5 (por ejemplo,
una VH y VL de Lox514, LX5140011, LX5140014, LX5140016,
10 LX5140038, LX5140094, LX5140108, LX5140110, LX5140092,
LX5140092_D, LX5140093, LX5140093_D, Lox696, LX6960067_ngl1,
LX6960071_ngl1, LX6960073_ngl1, LX6960086_ngl1,
LX6960094_ngl1, LX6960101_ngl1, LX6960102_ngl1,
LX6960116_ngl1, LX6960073_gl o LX6960073_G82bs_gl).

15 En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 aislada
comprende un conjunto de regiones determinantes de la
complementariedad (CDR): la CDR1 de la región variable de la
cadena pesada (VH), CDR2-VH, CDR3-VH y la CDR1 de la región
variable de la cadena ligera (VL), CDR2-VL y CDR3-VL donde:
20 (a) la CDR1-VH comprende la secuencia de aminoácidos: E L S
M H (SEQ ID NO: 1); (b) la CDR2-VH comprende la secuencia de
aminoácidos: G F D P E D HX1 HX2 HX3 HX4 HX5 HX6 Q K F Q G,
donde HX1 se selecciona a partir del grupo constituido por
G, W, Y y F, HX2 se selecciona a partir del grupo constituido
25 por E, T, Q, K, A y S, HX3 se selecciona a partir del grupo
constituido por T, Y, I y N, HX4 se selecciona a partir del
grupo constituido por I, A, R y H, HX5 se selecciona a partir
del grupo constituido por Y, V, T, L y Q, y HX6 se selecciona
a partir del grupo constituido por A, D, G, S y H (SEQ ID
30 NO: 71); (c) la CDR3-VH comprende la secuencia de
aminoácidos: HX7 HX8 G HX9 HX10 HX11 HX12 G V R G W D Y Y Y

G M D V, donde HX7 se selecciona a partir del grupo constituido por P, S y V, HX8 se selecciona a partir del grupo constituido por N, W, D y T, HX9 se selecciona a partir del grupo constituido por Q, R y T, HX10 se selecciona a partir del grupo constituido por Q y H, HX11 se selecciona a partir del grupo constituido por G y Q, y HX12 se selecciona a partir del grupo constituido por K y G (SEQ ID NO: 72); (d) la CDR1-VL comprende la secuencia de aminoácidos: T G S S S N I G A G Y D V H (SEQ ID NO: 30); (e) la CDR2-VL comprende la secuencia de aminoácidos: G N S N R P S (SEQ ID NO: 31); y (f) la CDR3-VL comprende la secuencia de aminoácidos: Q S Y D S LX1 LX2 LX3 LX4 LX5 LX6, donde LX1 se selecciona a partir del grupo constituido por M y S, LX2 se selecciona a partir del grupo constituido por L, Y y H, LX3 se selecciona a partir del grupo constituido por S y R, LX4 se selecciona a partir del grupo constituido por A y G o se omite (no hay aminoácidos), LX5 se selecciona a partir del grupo constituido por W y F y LX6 se selecciona a partir del grupo constituido por V, G y A (SEQ ID NO: 73).

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 se une al mismo epítipo que una proteína de unión a LOX-1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX-1 o un fragmento de este) que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena ligera (VL) descritas en la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5, incluida una proteína de unión a LOX-1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX-1 o un fragmento de este) que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID NO:4 y una secuencia de VL de la SEQ ID NO:33.

En otros aspectos, en la divulgación se proporcionan proteínas de unión a LOX1 (por ejemplo, anticuerpos tales como anticuerpos contra LOX1 completos, fragmentos de unión

a LOX1 de anticuerpos y variantes y derivados de estos) que compiten o compiten de manera cruzada por la unión a LOX1 con una proteína de unión a LOX-1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX-1 o un fragmento de este) que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena ligera (VL) descritas en la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5, incluida una proteína de unión a LOX-1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX-1 o un fragmento de este) que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID N0:4 y una secuencia de VL de la SEQ ID N0:33.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID N0:4 y una secuencia de VL de la SEQ ID N0:33.

En otros aspectos, en la divulgación se proporcionan proteínas de unión a LOX1 (por ejemplo, anticuerpos tales como anticuerpos contra LOX1 completos, fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos, y variantes y derivados de estos) que compiten o compiten de manera cruzada por la unión a LOX1 con un anticuerpo que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID N0:4 y una secuencia de VL de la SEQ ID N0:33.

En algunos aspectos, las proteínas de unión a LOX1 que se divulgan en la presente reducen la actividad de LOX1, la inhiben o son antagonistas respecto a ella. En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 tiene al menos una propiedad seleccionada a partir del grupo constituido por: (a) reduce o inhibe la unión de oxLDL, proteína C-reactiva (CRP) y/o productos finales de glucación avanzada (AGE) a LOX1, según se determina mediante cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en la presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo 10, ensayos 1, 2 y/o 3

o el Ejemplo 11); (b) disminuye o inhibe la señalización de RhoA/Rac1, monóxido de nitrógeno (NO), p38MAPK, proteínas-
cinasas B y C, ERK1/2 y/o NFκB en una célula endotelial que
expresa LOX1 en la superficie celular según se determina
5 mediante cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo
divulgado en la presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo
11); (c) disminuye o inhibe la actividad de la caspasa-8,
caspasa-9 y/o BAX en una célula endotelial que expresa LOX1
en la superficie celular según se determina mediante
10 cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en
la presente; (d) se une a LOX1 que tiene el polimorfismo
mononucleotídico K167N según se determina mediante cualquier
ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en la
presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo 10, ensayos 1,
15 2 y/o 3 o el Ejemplo 11); (e) reduce o inhibe la
internalización de oxLDL según se determina mediante
cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en
la presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo 10, ensayo
4 o Ejemplo 11); (f) reduce o inhibe la señalización de LOX1
20 inducida por oxLDL según se determina mediante cualquier
ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en la
presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo 20, ensayo 5
o el Ejemplo 11); (g) se une a LOX1 con una constante de
disociación (KD) de aproximadamente 150 pM a aproximadamente
25 600 pM (por ejemplo, de aproximadamente 400 pM) según se
determina mediante BIACORE o KinExA; (h) se une a LOX1 con
una constante de velocidad K_{on} de aproximadamente
 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a aproximadamente $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (por ejemplo,
de aproximadamente $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) según se determina mediante
30 BIACORE; e (i) se une a LOX1 con una constante de velocidad
 K_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a aproximadamente $3 \times 10^{-$

4 s^{-1} (por ejemplo, de aproximadamente $2.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) según se determina mediante BIACORE.

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 es un anticuerpo. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico o un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo. En algunos aspectos, el anticuerpo es un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo seleccionado a partir del grupo constituido por: un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fv, un diacuerpo y una molécula de anticuerpo monocatenaria.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 es un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina IgG1. En algunos aspectos, la región constante de la IgG1 comprende una mutación que disminuye la función efectora. En aspectos adicionales, la región constante de la IgG1 comprende la mutación triple L234F/L235E/P331S, que resulta en una IgG1 con la función efectora anulada.

En la divulgación se proporciona un ácido nucleico aislado o un conjunto de ácidos nucleicos que codifican una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX-1 o un fragmento de este). También se proporciona un vector o un conjunto de vectores que contienen los ácidos nucleicos o el conjunto de ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con los ácidos nucleicos aislados o vectores. En algunos aspectos, la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamíferos tal como una célula de mieloma murino NS0, una célula humana PER.C6® o una célula

de ovario de hámster chino (CHO). También se proporcionan células hospedadoras e hibridomas que producen proteínas de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX-1 o un fragmento de este).

5 En la divulgación también se proporciona un método para preparar una proteína de unión a LOX1 divulgada en la presente. En algunos aspectos, el método comprende cultivar una célula hospedadora o hibridoma capaz de expresar la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra
10 LOX-1 o un fragmento de este) en condiciones y, de manera opcional, proporciona un método para aislar la proteína de unión a LOX1 secretada por la célula hospederadora o hibridoma. Y en la divulgación se proporciona además la proteína de unión a LOX-1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX-1 o un
15 fragmento de este) aislada utilizando estos métodos.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX-1 o un fragmento de este) y un portador farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan métodos
20 para tratar, prevenir y/o mejorar una afección asociada con LOX1, actividad elevada de LOX1 y/o niveles de expresión elevados de LOX1, en un sujeto incluida, por ejemplo, la aterosclerosis, trombosis, arteriopatía coronaria (CAD), isquemia (por ejemplo, isquemia de miocardio), infarto (por
25 ejemplo, infarto de miocardio), síndrome coronario agudo (ACS), accidente cerebrovascular, lesión por reperfusión, reestenosis, enfermedad vascular periférica, hipertensión, insuficiencia cardíaca, inflamación (por ejemplo, inflamación crónica), angiogénesis, preeclampsia y/o cáncer
30 en un sujeto. En algunos aspectos, los métodos comprenden administrar a un sujeto que lo necesite, una composición

farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una proteína de unión a LOX1.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 se administra sola. En otros aspectos, la proteína de unión a LOX1 se administra como una terapia combinada. En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 se administra como una terapia combinada con la terapia/tratamiento habitual.

También se proporciona un método para reducir la actividad de LOX1 en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de una proteína de unión a LOX1 a un sujeto que lo necesite.

De manera adicional, se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la aterosclerosis. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a LOX1 a un sujeto que padece aterosclerosis. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 está en riesgo de desarrollar aterosclerosis. En algunos aspectos, el sujeto padece una afección proaterógena. En aspectos adicionales, la afección proaterógena es lupus sistémico eritematoso (SLE, por sus siglas en inglés), diabetes, hipertensión, hiperglucemia, insuficiencia cardíaca, lesión vascular, trasplante de órgano, dislipidemia (por ejemplo, hiperlipidemia), inflamación (por ejemplo, inflamación crónica e inflamación inducida por endotoxinas) y/o infección bacteriana. También se proporcionan métodos para reducir la aterosclerosis. En algunos casos, en la divulgación se proporciona un método para reducir la aterosclerosis en un sujeto que comprende

administrar una proteína de unión a LOX1 a un sujeto que padece aterosclerosis.

También se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la trombosis. En algunos casos, el método
5 comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) a un sujeto que padece trombosis. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 está en riesgo de desarrollar trombosis. En algunos aspectos,
10 la trombosis es una trombosis arterial. En aspectos adicionales, la trombosis es una trombosis arterial.

En la divulgación también se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la arteriopatía coronaria (CAD) o una afección asociada con la CAD. En algunos casos, el
15 método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece CAD. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 (por
20 ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) está en riesgo de desarrollar CAD. En algunos aspectos, el sujeto padece una afección proaterógena. En aspectos adicionales, la afección proaterógena es lupus sistémico eritematoso (SLE), diabetes, hipertensión, hiperglucemia,
25 insuficiencia cardíaca, lesión vascular, trasplante de órgano, dislipidemia (por ejemplo, hiperlipidemia), inflamación (por ejemplo, inflamación crónica e inflamación inducida por endotoxinas) y/o infección bacteriana.

En la divulgación también se proporcionan métodos para
30 tratar, prevenir y/o mejorar la isquemia o una afección asociada con la isquemia. En algunos casos, el método

comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece una isquemia. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) está en riesgo de desarrollar una isquemia. En algunos aspectos, el sujeto padece una isquemia de miocardio. En otros aspectos, el sujeto está en riesgo de desarrollar una isquemia de miocardio. En aspectos adicionales, el sujeto padece lupus sistémico eritematoso (SLE), diabetes, hipertensión, hiperglucemia, insuficiencia cardíaca, lesión vascular, trasplante de órgano, dislipidemia (por ejemplo, hiperlipidemia), inflamación (por ejemplo, inflamación crónica e inflamación inducida por endotoxinas) y/o una infección bacteriana.

También se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar un infarto o una afección asociada con un infarto. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece un infarto. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) está en riesgo de desarrollar un infarto. En algunos aspectos, el sujeto padece un infarto de miocardio. En otros aspectos, el sujeto está en riesgo de desarrollar un infarto de miocardio. En aspectos adicionales, el sujeto padece isquemia, lupus sistémico eritematoso (SLE), diabetes, hipertensión, hiperglucemia, insuficiencia cardíaca, lesión vascular,

trasplante de órgano, dislipidemia (por ejemplo, hiperlipidemia), inflamación (por ejemplo, inflamación crónica e inflamación inducida por endotoxinas) y/o una infección bacteriana.

5 En la divulgación también se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar el síndrome coronario agudo (ACS) o una afección asociada con el ACS. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de
10 este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece un ACS. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) está en riesgo de desarrollar un ACS. En algunos aspectos,
15 el sujeto presenta una cantidad sérica elevada de LOX1 (sLOX1) o una actividad de LOX1 elevada. En aspectos adicionales, el sujeto padece aterosclerosis.

 En la divulgación también se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar un accidente cerebrovascular o
20 una afección asociada con un accidente cerebrovascular. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que ha padecido un accidente
25 cerebrovascular. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 está en riesgo de padecer un accidente cerebrovascular. En algunos aspectos, el sujeto presenta una cantidad sérica elevada de sLOX1 y/o una actividad de LOX1 elevada. En aspectos adicionales, el
30 sujeto padece aterosclerosis.

También se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la lesión por reperfusión o una afección asociada con la lesión por reperfusión. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece una lesión por reperfusión. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) está en riesgo de desarrollar una lesión por reperfusión. En algunos aspectos, el sujeto se va a someter a una cirugía. En otros aspectos, el sujeto se ha sometido a una cirugía. En algunos aspectos, la cirugía es un trasplante o una cirugía de derivación coronaria. En aspectos adicionales, el paciente padece o está en riesgo de desarrollar un infarto de miocardio con una lesión por reperfusión. En aspectos adicionales, el método disminuye la lesión de miocardio, reduce la cantidad de isoenzima creatina-cinasa-MB (CK-MB) sérica y malondialdehído (MDA) sérico, reduce el tamaño de los cardiomiocitos, reduce la infiltración de leucocitos en el lugar de la lesión y/o reduce la disfunción cardíaca (por ejemplo, reduce la presión ventricular izquierda (LVP, por sus siglas en inglés) y aumenta la presión telediastólica ventricular izquierda (LVEDP, por sus siglas en inglés). En aspectos adicionales, el método aumenta el volumen de eyección, el acortamiento fraccional y/o la fracción de inyección del corazón.

En la divulgación también se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la reestenosis o una afección asociada con la reestenosis. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por

ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece reestenosis. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 está en riesgo de desarrollar reestenosis. En algunos aspectos, el sujeto se va a someter a una cirugía. En otros aspectos, el sujeto se ha sometido a una cirugía. En algunos aspectos, la cirugía es un procedimiento endovascular, es cirugía vascular, cirugía cardíaca o angioplastia. En aspectos adicionales la reestenosis, el procedimiento es un trasplante o una cirugía de derivación coronaria. En aspectos adicionales la reestenosis tratada, prevenida y/o mejorada es una reestenosis de la endoprótesis o una reestenosis posangioplástica.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la enfermedad vascular periférica (PVD) o una afección asociada con la PVD. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece PVD. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 está en riesgo de desarrollar la PVD. En algunos aspectos, el sujeto presenta una cantidad sérica elevada de sLOX1 y/o una actividad de LOX1 elevada. En aspectos adicionales, el sujeto padece aterosclerosis.

En la divulgación también se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la inflamación o una afección asociada con la inflamación. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en

una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece inflamación. En algunos casos, el sujeto padece inflamación crónica. En algunos aspectos, el sujeto presenta una cantidad sérica elevada de oxLDL y/o sLOX1 y/o una actividad de LOX1 elevada. En aspectos adicionales, el sujeto padece aterosclerosis.

En la divulgación también se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la preeclampsia o una afección asociada con la preeclampsia. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece preeclampsia o eclampsia. En aspectos adicionales, el sujeto padece hipertensión arterial y una cantidad elevada de proteínas en la orina. En algunos aspectos, el sujeto presenta una cantidad sérica elevada de oxLDL y/o sLOX1 y/o una actividad de LOX1 elevada. En aspectos adicionales, el sujeto presenta hinchazón en los pies, piernas y/o manos.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporcionan métodos para estabilizar una placa aterosclerótica en un sujeto. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) a un sujeto que lo necesite. En algunos aspectos, el método reduce la ruta de transducción de señales por RhoA/Rac1, monóxido de nitrógeno, p38MAPK, proteína-cinasas B y C, ERK1/2 y/o NF κ B en la placa. En otros aspectos, el método disminuye la apoptosis en la placa. En aspectos adicionales, el método

disminuye la actividad de la caspasa 8, caspasa 9 y/o BAX y/o aumenta la actividad de BCL-2 en la placa. En otros aspectos, el método disminuye la cantidad de una molécula de adhesión o citocina producida por la placa. En aspectos
5 adicionales, el método disminuye la expresión de E-selectina, P-selectina, ICAM-1, VCAM-1, MCP1 y/o CD40/CD40L por parte de la placa. En aspectos adicionales, el método disminuye el tamaño o la formación de la placa aterosclerótica, la acumulación de macrófagos y/o la
10 expresión de MMP (por ejemplo, MMP9) en la placa aterosclerótica. En aspectos adicionales, el método da como resultado una disminución de la evolución o una regresión de la placa.

También se proporcionan métodos para reducir la pérdida
15 de tono vascular en un sujeto. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) a un sujeto
20 que lo necesite. En algunos aspectos, el método reduce la pérdida de tono vascular. En aspectos adicionales, el método reduce la pérdida de tono vascular en un sujeto regulando la producción de NO impulsada por HDL (capacidad del anticuerpo de estimular la producción de NO endotelial). De forma
25 adicional, se proporcionan métodos para mejorar el tono vascular en un sujeto. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 a un sujeto que lo necesite.

De manera adicional, se proporcionan métodos para
30 tratar, prevenir y/o mejorar el cáncer. En algunos casos, en la divulgación se proporciona un método para tratar, prevenir

y/o mejorar el cáncer en un sujeto que comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) a un sujeto que padece cáncer. En algunos aspectos, el sujeto padece un cáncer
5 seleccionado a partir del grupo constituido por: cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer ovárico, melanoma, cáncer cervicouterino, cáncer de pulmón, cáncer uterino, cáncer renal y cáncer pancreático.

También se proporcionan métodos para inhibir la
10 proliferación o migración de las células tumorales, o la invasión por parte de estas. En algunos casos, en la divulgación se proporciona un método para antagonizar la actividad de LOX1 que comprende poner en contacto una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra
15 LOX1 o un fragmento de este) con una célula tumoral que expresa LOX1. En algunos aspectos, la célula tumoral procede de un cáncer seleccionado a partir del grupo constituido por: cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer ovárico, melanoma, cáncer cervicouterino, cáncer de pulmón, cáncer
20 uterino, cáncer renal y cáncer pancreático. En algunos aspectos, la célula tumoral procede de una línea cancerosa.

En la divulgación se proporcionan de manera adicional métodos para reducir o inhibir la angiogénesis. En algunos aspectos, el método para reducir o inhibir la angiogénesis
25 comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) a un sujeto que lo necesite. En algunos aspectos, el sujeto padece una afección asociada con una angiogénesis patológica. En aspectos adicionales, en la divulgación se
30 proporciona un método para inhibir la angiogénesis que comprende poner en contacto una proteína de unión a LOX1

(por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) con una célula que expresa LOX1. En algunos aspectos, la célula es una célula endotelial. En aspectos adicionales, la célula endotelial es una célula endotelial coronaria. En algunos aspectos, el método se realiza *in vitro*. En otros aspectos, el método se realiza *in vivo*.

De manera adicional, se proporcionan métodos para bloquear o reducir la actividad de LOX1. En algunos aspectos, en la divulgación se proporcionan métodos para bloquear la actividad de LOX1 que comprenden administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) que reduce o inhibe la interacción entre LOX1 y una proteína de unión a LOX1 tal como oxLDL, AGE y/o CRP. En algunos aspectos, se expresa LOX1 en la superficie de una célula endotelial, macrófago, célula vascular del músculo liso y/o trombocito. En algunos aspectos, la célula es una célula endotelial tal como una célula endotelial coronaria. En aspectos adicionales, la célula es una célula del músculo liso vascular, macrófago o trombocito. En otros aspectos, la célula es parte de un tejido aterosclerótico. En algunos aspectos, el método se realiza *in vivo*. En otros aspectos, el método se realiza *in vitro*. En algunos aspectos, actividad de LOX1 bloqueada o reducida es la unión a oxLDL y/o la captación (por ejemplo, internalización) de esta. En aspectos adicionales, la actividad de LOX1 bloqueada o reducida es la inducción de p38 (MAPK), p44/42 MAPK, proteína-quinasa C (PKC), proteína-quinasa B (PKB), proteína tirosina-quinasa (PTK), factor de transcripción NF-KB y/o ruta de señalización de AP1. En aspectos adicionales, la actividad de LOX1 bloqueada o reducida es la inducción de la apoptosis. En realizaciones adicionales, la inducción de la

apoptosis está mediada por la caspasa-9, caspasa-3 y/o Bcl-2. En aspectos adicionales, la actividad de LOX1 bloqueada o reducida es la expresión de las cadenas A y B de PDFG y/o la proteína similar a EGF de unión a la heparina (HB-EGF, por sus siglas en inglés) en las células endoteliales que expresan LOX1. En algunos aspectos, la actividad de LOX1 bloqueada o reducida es una actividad de LOX1 inducida por la unión de oxLDL a LOX1.

De manera adicional, se proporcionan métodos para bloquear o reducir la actividad de LOX1 en una afección patológica asociada con un aumento de los niveles de actividad de LOX1 o los niveles de expresión de LOX1 (por ejemplo, cantidad de proteína sérica sLOX1). En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) a un sujeto que presenta un aumento de la actividad de LOX1 o de los niveles de expresión de LOX1 (por ejemplo, cantidad de proteína sérica sLOX1). En algunos aspectos, la afección patológica es lupus sistémico eritematoso (SLE, por sus siglas en inglés), diabetes, hipertensión, hiperglucemia, insuficiencia cardíaca, lesión vascular, trasplante, dislipidemia (hiperlipidemia), inflamación (por ejemplo, inflamación crónica e inflamación inducida por endotoxinas) o infección bacteriana. En algunos aspectos, el sujeto presenta niveles elevados de oxLDL séricos. En algunos aspectos, el sujeto presenta una elevación de la cantidad sérica de oxLDL, LDL modificada por la 15-lipoxigenasa, HDL modificada por la 15-lipoxigenasa, LDL glioxidada, lisofosfatidilcolinesterasa (LPC) y/o ácido palmítico. En aspectos adicionales, el sujeto presenta una cantidad sérica elevada de TNF α , IL1, interferón γ , LPS (lipopolisacárido),

CRP, angiotensina II, endotelina I y/o AGE. En aspectos adicionales, el sujeto presenta una cantidad sérica elevada de LOX1 soluble (sLOX1). En algunos aspectos, el sujeto presenta un polimorfismo mononucleotídico (SNP) en el gen
5 LOX1. En algunos aspectos, el SNP en el gen LOX1 es una variante K167N de LOX1.

También se proporcionan métodos para agonizar o aumentar una actividad de la lipoproteína de alta densidad (HDL). En algunos aspectos, en la divulgación se proporciona
10 un método para aumentar o agonizar una actividad de la HDL administrando una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) a un sujeto que lo necesite. En algunos aspectos, la actividad de HDL aumentada es la estimulación de la producción de NO
15 endotelial mediada por HDL. En algunos aspectos, la actividad de HDL aumentada es la inhibición de la actividad de señalización de NFκB de la célula endotelial. En algunos aspectos, la actividad de HDL aumentada es la estimulación de la reparación celular endotelial. En algunos aspectos, la
20 actividad de HDL aumentada es la reducción de la inflamación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

En la **Figura 1** se muestra la inhibición de la unión de oxLDL, AGE-BSA y CRP a LOX1 humano (hLOX1) por parte de los anticuerpos LOX514 y LOX696. Se midió la unión de ox-LDL
25 marcada con DyLight 649 (**Figura 1A**) o AGE-BSA marcado con DyLight 649 (**Figura 1B**) a células transfectadas con hLOX1 o la unión de la proteína C-reactiva (CRP) marcada con biotina a hLOX1 recombinante (**Figura 1C**) en presencia de LOX514 ("LOX10514-IgG1-TM") (rombos), LOX696 ("LOX10696-IgG1-TM")
30 (círculos) o 23C11 (cuadrados), un anticuerpo contra LOX1 de ratón comercializado. Se muestran gráficos representativos

en las Figuras 1A, 1B y 1C que ilustran la inhibición dependiente de la dosis de la unión de oxLDL, AGE-BSA y CRP, respectivamente, por parte de LOX514 y LOX696. Además, LOX514 y LOX696 también bloquean la unión de ox-LDL marcada con DyLight 649 a células transfectadas con hLOX1 K167N (**Figura 1D**) lo que confirma que estos anticuerpos se unen y bloquean la unión de oxLDL a la variante SNP K167N de LOX1. Estos resultados demuestran una inhibición específica, multiligando de la unión a LOX1 de oxLDL, AGE-BSA y CRP por parte de los anticuerpos LOX514 y LOX696; y que LOX514 y LOX696 presentan una reactividad funcionalmente cruzada con la variante SNP K167N de LOX1 común. M = concentración molar del anticuerpo; las barras indican el error estándar.

En la **Figura 2** se muestra la inhibición de la internalización de oxLDL y de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) dependiente de oxLDL por parte de los anticuerpos LOX514 y LOX696. Se midió la internalización de ox-LDL marcada con Cyper 5E (**Figura 2A**) o la generación de ROS dependiente de oxLDL (**Figura 2B**) en células transfectadas con LOX1 humano en presencia de LOX514 ("LOX10514-IgG1-TM") (rombos), LOX696 ("LOX10696-IgG1-TM") (círculos) o 23C11 (cuadrados), un anticuerpo contra LOX-1 de ratón comercializado. Se muestran gráficos representativos en las Figuras 2A y 2B que ilustran la inhibición dependiente de la dosis de la internalización de oxLDL y de la señalización dependiente de oxLDL, respectivamente, por parte de LOX514 y LOX696. Para la generación de ROS dependiente de oxLDL en células transfectadas con hLOX1, se muestran las unidades de fluorescencia relativa (RFU, por sus siglas en inglés) de la cantidad de carboxidiclorofluoresceína (DCF) generada en el

ensayo con LOX514, LOX696 y 23C11, como un promedio de tres réplicas (**Figura 2B**). Estos resultados demuestran que los anticuerpos LOX514 y LOX696 inhiben la internalización de oxLDL y la señalización de LOX-1 dependiente de ox-LDL. M =
5 concentración molar del anticuerpo; las barras indican el error estándar.

En la **Figura 3** se muestra la reactividad cruzada entre especies de los anticuerpos contra LOX1, LOX514 y LOX696. Se evaluó la reactividad cruzada de los anticuerpos contra LOX1
10 humano respecto a ortólogos de LOX1 de varias especies utilizando un ELISA de unión a scFv. Tal como se muestra en la **Figura 3A**, LOX514 ("LOX10514") y LOX696 ("LOX10696") se unen a LOX1 humano y de cinomolgo, pero no a los ortólogos de LOX1 de ratón, rata o conejo o a la albúmina sérica bovina
15 (control negativo). También se evaluó la especificidad de LOX514 y LOX696 a otros receptores humanos depuradores y de lectina de tipo C relacionados con LOX-1 utilizando un ELISA de unión a IgG. Tal como se muestra en la **Figura 3B**, LOX514 ("LOX10514 IgG1-TM") y LOX696 ("LOX10696 IgG1-TM") se unen
20 únicamente a LOX1 humano y no se unen a CLEC-7A, CLEC-1A, CLEC-4L, CLEC-1B, SR-A1 o SR-B3 humanos. Tal como se esperaba, CAT252 IgG1-TM, un anticuerpo de control isotípico, no se unió a ninguno de los receptores humanos depuradores o de la lectina de tipo C estudiados. CLEC-7A =
25 miembro A de la familia 7 del dominio de lectina de tipo C (también conocido como Dectin-1); CLEC-1A = miembro A de la familia 1 del dominio de lectina de tipo C; CLEC-4L = miembro L de la familia 4 del dominio de lectina de tipo C (también conocido como DC-SIGN); CLEC-1B = miembro B de la familia 1
30 del dominio de lectina de tipo C (también conocido como CLEC-2); SR-A1 = tipos I y II del receptor depurador de los

macrófagos (también conocido como MSR); SR-B3 = glucoproteína 4 de los trombocitos (también conocida como CD36). Las barras indican el error estándar.

En la **Figura 4** se muestra una comparación entre LOX514 y varios anticuerpos LOX514 optimizados. Se muestran las alineaciones de secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) (**Figura 4A**) o la región variable de la cadena ligera (VL) (**Figura 4B**) entre LOX514 y anticuerpos LOX514 optimizados. Se resaltan las diferencias entre VH o VL de LOX514. FW = armazón; CDR = regiones determinantes de la complementariedad.

En la **Figura 5** se muestra una comparación entre LOX696 y varios anticuerpos LOX696 optimizados. Se muestran las alineaciones de secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) (**Figura 5A**) o la región variable de la cadena ligera (VL) (**Figura 5B**) entre LOX696 y anticuerpos LOX696 optimizados. Se resaltan las diferencias entre VH o VL de LOX696. FW = armazón; CDR = regiones determinantes de la complementariedad.

En la **Figura 6** se muestra la especificidad de los anticuerpos contra LOX1 para LOX1 humano en comparación con varios receptores humanos depuradores y de lectina de tipo C relacionados con LOX-1. Se evaluó la especificidad de los anticuerpos contra LOX1 LX5140108, LX5140110, LX5140092_N>D, LX5140093_N>D, LX6960073_g1 ("LX6960073") y LX6960073_G82bS_g1 ("LX6960073G82bS") en un formato IgG1-TM respecto a LOX-1 humano y otros receptores humanos depuradores y de lectina de tipo C relacionados con LOX-1 utilizando un ELISA de unión a IgG. LX5140108, LX5140110, LX5140092_N>D, LX5140093_N>D, LX6960073_g1 y LX6960073_G82bS_g1 se unen únicamente a LOX1 humano y no se

unen a CLEC-7A, CLEC-1A, CLEC-4L, CLEC-1B, SR-A1 o SR-B3 humanos. NIP228, un anticuerpo de control isotípico humano IgG1-TM, no se unió a LOX-1 humano ni a ninguno de los receptores humanos depuradores o de la lectina de tipo C
5 estudiados. CLEC-7A = miembro A de la familia 7 del dominio de lectina de tipo C (también conocido como Dectin-1); CLEC-1A = miembro A de la familia 1 del dominio de lectina de tipo C; CLEC-4L = miembro L de la familia 4 del dominio de lectina de tipo C (también conocido como DC-SIGN); CLEC-1B
10 = miembro B de la familia 1 del dominio de lectina de tipo C (también conocido como CLEC-2); SR-A1 = tipos I y II del receptor depurador de los macrófagos (también conocido como MSR); SR-B3 = glucoproteína 4 de los trombocitos (también conocida como CD36). Las barras indican el error estándar.

15 En la **Figura 7** se muestra la reactividad cruzada de los anticuerpos contra LOX1 respecto a ortólogos de LOX1 de varias especies. Se evaluó la reactividad cruzada de los anticuerpos contra LOX1 LX5140108, LX5140110, LX5140092_N>D, LX5140093_N>D, LX6960073_gl y LX6960073_G82bS_gl en un
20 formato IgG1-TM respecto a ortólogos de LOX1 de varias especies utilizando un ELISA de unión a IgG. Tal como se muestra en la **Figura 7A**, los anticuerpos contra LOX1 LX5140108, LX5140110, LX5140092_N>D, LX5140093_N>D, LX6960073_gl y LX6960073_G82bS_gl se unen a LOX1 humano y de
25 cinomolgo pero no a los ortólogos de LOX1 de ratón o rata o a CD86 (control negativo). Únicamente, LX5140108, LX5140110 y LX5140092_N>D se unen a LOX-1 de conejo. NIP228, un anticuerpo de control isotípico humano IgG1-TM, no se unió a CD86 ni a ninguno de los ortólogos de LOX-1 estudiados.
30 Además, se llevó a cabo la caracterización de la reactividad cruzada entre LOX1 humano (huLOX) y de cinomolgo (CyLOX)

para los anticuerpos IgG1-TM contra LOX1 LX5140108, LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl ("LX6960073_G82bS") utilizando un ELISA competitivo. Tal como se muestra en la **Figura 7B**, LX5140108 (círculos), LX5140110 (cuadrados) y LX6960073_G82bS_gl (triángulos) compiten tanto con LOX1 de cinomolgo como LOX1 humano, lo que confirma adicionalmente la reactividad cruzada respecto a cinomolgo de los anticuerpos contra LOX1 LX5140108, LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl. Las barras indican el error estándar.

En la **Figura 8** se muestra la inhibición de la unión de oxLDL, AGE-BSA y CRP a LOX1 humano (hLOX1), la inhibición de la internalización de oxLDL y la inhibición de la señalización de LOX-1 dependiente de oxLDL por parte de los anticuerpos LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl. Se midió la unión de ox-LDL marcada con DyLight 649 (**Figura 8A**) o AGE-BSA marcado con DyLight 649 (**Figura 8B**) a células transfectadas con hLOX1 o la unión de la proteína C-reactiva (CRP) marcada con biotina a hLOX1 recombinante (**Figura 8C**) en presencia de LX5140110-IgG1-TM ("LOX514_110"; círculos en las Figuras 8A y 8C, cuadrados en la Figura 8B) o LX6960073_G82bS_gl-IgG1-TM ("LX6960073_G82bS"; cuadrados en las Figuras 8A y 8C, círculos en la Figura 8B). Se muestran gráficos representativos en las Figuras 8A, 8B y 8C que ilustran la inhibición dependiente de la dosis de la unión de oxLDL, AGE-BSA y CRP a hLOX1, respectivamente, por parte de LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl. Además, LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl también bloquean la unión de ox-LDL marcada con DyLight 649 a células transfectadas con hLOX1 K167N (**Figura 8D**) lo que confirma que estos anticuerpos se unen y bloquean la unión de oxLDL a la variante SNP K167N de LOX1. Para examinar la capacidad de LX5140110 y

LX6960073_G82bS_gl de bloquear la internalización de oxLDL y la señalización de LOX-1 dependiente de oxLDL, se midió la internalización de ox-LDL marcada con cyper 5E (**Figura 8E**) o la generación de ROS dependiente de ox-LDL (**Figura 8F**) en

5 células transfectadas con LOX1 humano en presencia de LX5140110-IgG1-TM ("514_110", círculos en la Figura 8E; y "LOX10514_110", rombos en la Figura 8F) o LX6960073_G82bS_gl-IgG1-TM ("LX6960073_G82bS", cuadrados en la Figura 8E; y "LOX10696_73", cuadrados en la Figura 8F).

10 Se muestran gráficos representativos en las Figuras 8E y 8F que ilustran la inhibición dependiente de la dosis de la internalización de oxLDL y de la producción de ROS dependiente de oxLDL, respectivamente, por parte de LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl. Con estos resultados se

15 demuestra: (1) la inhibición específica, multiligando de la unión de oxLDL, AGE-BSA y CRP a LOX1 por parte de los anticuerpos LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl; (2) la reacción cruzada de LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl con la variante SNP K167N de LOX1 común; y (3) la inhibición de LX5140110 y

20 LX6960073_G82bS_gl de la internalización de oxLDL y la señalización de LOX-1 dependiente de oxLDL. M = concentración molar del anticuerpo; las barras indican el error estándar.

En la **Figura 9A** se muestra la inhibición de la captación de oxLDL en las células endoteliales aórticas humanas (HAEC, por sus siglas en inglés) por parte de LX5140110. Se midió la captación de AlexaFluor568-OxLDL por parte de HAEC incubadas con el anticuerpo contra LOX1 LX5140110 ("514") 0, 0.5, 1, 5 o 10 nM o el anticuerpo de control (NIP) 10 nM utilizando microscopía de fluorescencia para estudiar la

30 capacidad de LX5140110 de bloquear la unión y la internalización de lipoproteínas de baja densidad oxidadas

(oxLDL) por parte de las HACE. Se analizaron aproximadamente 12 imágenes para cada conjunto y se determinó el número promedio de vesículas fluorescentes rojas con oxLDL conjugada con Alexafluor-568 en cada célula tras una incubación de 1 h. Se presenta el número de vesículas por célula con 1 desviación estándar. Con estos resultados se demuestra que LX5140110 5 nM o 10 nM inhibe significativamente la captación de oxLDL por parte de las HAEC ($p = 0.0003$ o $p = 0.0002$ para 5 nM y 10 nM, respectivamente). * indica que $P < 0.05$ en comparación con los controles no tratados (células incubadas únicamente con oxLDL marcada con Alexa-Fluor y sin anticuerpo); las barras indican la desviación estándar.

En la **Figura 9B** se muestra la reducción de la señalización de NF κ B dependiente de oxLDL en las células endoteliales aórticas humanas (HAEC) por parte de LX5140110. Las HAEC que coexpresaban NF κ B-luciferasa y GFP se sometieron a una restricción de suero durante 24 horas y se incubaron durante 8 horas con: vehículo (control); solo oxLDL (50 μ g/mL); oxLDL (50 μ g/mL) + LX5140110 ("514") (10 nM); o oxLDL (50 μ g/mL) + NIP (10 nM). Se midió la actividad luciferasa y la luminiscencia, a la vez que se utilizaba la fluorescencia de GFP como un control de normalización. Con estos resultados se demuestra que la adición de LX5140110 10 nM, pero no de NIP (anticuerpo de control), reduce significativamente la señalización de NF κ B dependiente de oxLDL en las HAEC. $N = 5$ para cada grupo; * indica $P < 0.05$ (comparado con el control que solo tiene vehículo); # indica $P < 0.05$ (comparado con el caso en el que solo hay oxLDL); las barras indican el error estándar.

En la **Figura 9C** se muestra la inhibición del aumento dependiente de oxLDL de la actividad arginasa en las células endoteliales aórticas humanas (HAEC) por parte de LX5140110. Las HAEC se sometieron a una restricción de suero durante 24 horas y se incubaron durante 3 horas con: solo vehículo (control); oxLDL (50 µg/mL); oxLDL (50 µg/mL) + LX5140110 ("514") (1 nM); oxLDL (50 µg/mL) + LX5140110 ("514") (3 nM); oxLDL (50 µg/mL) + LX5140110 ("514") 10 nM; u oxLDL (50 µg/mL) + NIP (10 nM). Las células se lisaron y se determinó la actividad arginasa utilizando el ensayo con urea. Con estos resultados se demuestra que la adición de LX5140110 3 nM o 10 nM, pero no de NIP 10 nM (anticuerpo de control), reduce significativamente la actividad arginasa dependiente de oxLDL en las HAEC de una manera dependiente de la dosis. N = 3 para cada grupo; * indica $P < 0.05$ comparado con los controles que solo tienen vehículo; # indica $P < 0.05$ comparado con el control con oxLDL (50 µg/mL) (sin anticuerpo); las barras indican el error estándar.

En la **Figura 9D** se muestra que LX5140110 bloquea la reducción dependiente de oxLDL de la producción de óxido nítrico por parte de las HAEC. Las HAEC se sometieron a una restricción de suero (1% de suero) durante toda la noche y se incubaron durante 24 h con: vehículo (control); oxLDL (50 µg/mL); oxLDL (50 µg/mL) + LX5140110 ("514") (0.5 nM); oxLDL (50 µg/mL) + LX5140110 ("514") (1 nM); oxLDL (50 µg/mL) + LX5140110 ("514") (5 nM); oxLDL (50 µg/mL) + LX5140110 ("514") (10 nM); u oxLDL (50 µg/mL) + NIP (10 nM) antes de añadir DAF-FM DA (5 µM) en medio fresco y medir la fluorescencia total de DAF-FM DA. Con estos resultados se demuestra que la adición de LX5140110 5 nM o 10 nM, pero no de NIP 10 nM (anticuerpo de control), inhibe

significativamente la reducción dependiente de oxLDL de la producción de óxido nítrico en las HAEC de una manera dependiente de la dosis. Para confirmar que la eNOS produjo óxido nítrico (NO), se utilizó el inhibidor de la NOS L-NAME como un control (datos que no se muestran). N = 5 para cada grupo; * indica que $P < 0.05$ (comparado con el control que solo tiene vehículo); las barras indican el error estándar.

En la **Figura 9E** se muestra que LX5140110 bloquea el aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) dependiente de oxLDL por parte de las HAEC. Las HAEC se sometieron a una restricción de suero (1% de suero) durante toda la noche y se incubaron durante 24 h con: vehículo (control); oxLDL (50 µg/mL); oxLDL (50 µg/mL) + LX5140110 ("514") (0.5 nM); oxLDL (50 µg/mL) + LX5140110 ("514") (1 nM); oxLDL (50 µg/mL) + LX5140110 ("514") (5 nM); oxLDL (50 µg/mL) + LX5140110 ("514") (10 nM); u oxLDL (50 µg/mL) + NIP (10 nM) antes de incubar las células con medio fresco exento de fenol que contenía una concentración 400 µM del análogo de luminol L-012. Las unidades de luz relativas (RLU, por sus siglas en inglés) cuantificadas a partir de la luminiscencia del análogo de luminol L-012 indican cambios en la producción de ROS. Con estos resultados se demuestra que la adición de LX5140110 0.5 nM, 1 nM, 5 nM o 10 nM, pero no de NIP 10 nM (anticuerpo de control), inhibe la producción de ROS dependiente de oxLDL en las HAEC. Para confirmar que la eNOS produjo superóxido, se utilizó el inhibidor de la NOS L-NAME como un control (datos que se muestran ahora). N = 5 para cada grupo; * indica $P < 0.05$ comparado con los controles que solo tienen vehículo; # indica $P < 0.05$ comparado con el control con

oxLDL (50 µg/mL) (sin anticuerpo); las barras indican el error estándar.

En la **Figura 9F** se muestra que el análogo de luminol L-012 es específico para las especies reactivas del oxígeno (ROS). Las HAEC se sometieron a una restricción de suero (1% de suero) durante toda la noche y se incubaron durante 24 h con: vehículo (Veh) o el depurador de superóxido SOD (5 mM). Tal como se muestra, la adición del depurador de superóxido SOD dio como resultado niveles prácticamente indetectables de luminiscencia lo que confirma la especificidad de L-012 para medir superóxido (ROS) en la Figura 9E. * indica que $P < 0.05$ (comparado con el vehículo); las barras indican el error estándar.

En las **Figuras 9G y 9H** se muestra que LX5140110 bloquea la fosforilación mediada por oxLDL de la cinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés) en la tirosina (Y) 397. Las HAEC se sometieron a una restricción de suero durante 18 h y se incubaron durante 1 h con: una concentración 0, 0.1, 0.5, 1, 5 o 10 nM de anticuerpo contra LOX1 LX5140110 (514), o una concentración 10 nM del anticuerpo de control (NIP) antes de incubar las células durante 1 h en medio fresco con 50 µg/mL de OxLDL y analizar en geles de poliacrilamida con un gradiente de un 4-5% 10 µg de lisados proteicos. Las muestras proteicas sometidas a SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para una inmunoelectrotransferencia. En la **Figura 9G** se muestra una transferencia representativa en la que se aprecian los cambios en la fosforilación de FAK en Tyr397 y la expresión de GAPDH, mientras que en la **Figura 9H** se muestra la cuantificación del incremento porcentual de la fosforilación de FAK en Tyr397 (pY397-FAK) normalizado respecto a la

expresión de GAPDH. Con estos resultados se demuestra que la adición de LX5140110 5 nM o 10 nM, pero no de NIP 10 nM (anticuerpo de control), inhibe la fosforilación de FAK mediada por oxLDL en Tyr397 en las HAEC. * indica que P < 0.05 (comparado con el control no tratado); # indica que P < 0.05 comparado con LX5140110 (514) 0 nM; las barras indican el error estándar.

En la **Figura 9I** se muestra que LOX1 es necesario para la señalización de oxLDL en las HAEC. Se cotransdujeron células endoteliales aórticas humanas (HACE) con adenovirus que codifican NFkB-LUC y con un ARNhc (Ad-NDhc) no dirigido o ARNhc contra Lox-1 (Ad-Lox-1hc) para inhibir específicamente la expresión de LOX1. 24 h después de la transducción, las células se trataron con o sin oxLDL (50 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se midió la actividad de la luciferasa de luciérnaga en lisados celulares utilizando quimioluminiscencia. Ad-LOX-1hc inhibió significativamente la señalización de NFkB mediada por oxLDL en las HACE en comparación con células incubadas con un control, virus de ARNhc no dirigido (Ad-NDhc). * indica P < 0.05 (comparado con el control no tratado); # indica P < 0.05 comparado con OxLDL + Ad-NDhc.

En la **Figura 9J** se muestra un vector viral que expresa ARN horquillados cortos de interferencia (ARNhc) dirigidos a la región 5'UTR del gen LOX1 humano (LOX-ARNhc) reduce la expresión de la proteína LOX1. Se monitoriza la expresión de la proteína LOX1 por inmunotransferencia utilizando los anticuerpos contra Lox1 (IB:LOX-1) y contra GAPDH (IB:GAPDH, utilizado en la presente como control de la cantidad de proteína) de las siguientes muestras: Lisados de HAEC transducidos con ARNhc no dirigido (ARNhc ND) (carriles 1 y

2) o lisados de HAEC transducidos con ARNhc contra Lox-1 (carril 3). Los lisados en los carriles 2 y 3 se trataron con oxLDL (50 μ g/mL), mientras que los lisados del carril 1 no se expusieron a oxLDL. La adición de LOX1-ARNhc reduce significativamente la expresión de la proteína LOX1 (carril 3) en comparación con los niveles que se miden en los lisados de las células tratadas con ARNhc no dirigido (carriles 1 y 2). Con estos datos se confirma que LOX1-ARNhc inhibe de manera eficaz la expresión de LOX1 en las HAEC.

En la **Figura 9K** se muestra que un vector viral que expresa ARN horquillados cortos de interferencia (ARNhc) dirigidos a la región 5'UTR del gen LOX1 humano (Ad-LOX-1ARNhc) reduce la expresión de la proteína LOX1 de una manera dependiente de la dosis. Las HAEC transducidas con concentraciones crecientes de ARNhc contra Lox-1 (Ad-LOX-1ARNhc) (0, 10, 20, 30 y 100 MOI en los carriles 1-5, respectivamente) se estimularon con OxLDL (50 μ g/mL) (con la excepción de la muestra de control no estimulada que se muestra en el carril 1). Se obtuvieron lisados celulares y se sometieron a inmunotransferencia con el anticuerpo contra Lox-1. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes. Ad-LOX-1ARNhc redujo significativamente la expresión de la proteína LOX1 de una manera dependiente de la dosis.

En la **Figura 10** se muestran algunas de las rutas de señalización que participan en la señalización del receptor LOX1 que bloquean los anticuerpos contra LOX1 divulgados en la presente, incluido LX5140110 ("514Ab").

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En la presente divulgación se proporcionan proteínas de unión a LOX1. En algunos aspectos, en la divulgación se

proporcionan antagonistas de la actividad de LOX1 que son anticuerpos contra LOX1 tales como anticuerpos contra LOX1 completos, fragmentos de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos. También se proporcionan
5 ácidos nucleicos relacionados, composiciones que comprenden proteínas de unión a LOX1 y métodos para preparar las proteínas de unión a LOX1. Se proporcionan además métodos para utilizar las proteínas de unión a LOX1 en, por ejemplo, la mejora de las enfermedades o afecciones asociadas con una
10 proteína de unión a LOX tales como: aterosclerosis, trombosis, arteriopatía coronaria (CAD), isquemia (por ejemplo, isquemia de miocardio), infarto (por ejemplo, infarto de miocardio), síndrome coronario agudo (ACS), accidente cerebrovascular, lesión por reperfusión,
15 reestenosis, enfermedad vascular periférica, hipertensión, insuficiencia cardíaca, inflamación (por ejemplo, inflamación crónica), angiogénesis, preeclampsia o cáncer en un sujeto y los usos diagnósticos.

Para que la presente divulgación pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar se definen determinados
20 términos. Las definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

I. Definiciones

Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y en
25 las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/o", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. El término "un/o" (o "una"), así como las expresiones "uno o más" y "al menos uno" se pueden utilizar indistintamente en la presente.

30 El término "aproximadamente" se utiliza en la presente para referirse a de forma aproximada, en la región de, más

o menos, o alrededor de. Cuando el término "aproximadamente" se utiliza conjuntamente con un intervalo o valor numérico, este modifica ese valor o intervalo extendiendo sus límites por encima y por debajo de los valores o intervalos numéricos expuestos. En general, el término "aproximadamente" se utiliza en la presente para modificar un valor o intervalo numérico por encima y por debajo del valor o intervalo indicado con una variación de un 10%.

Además, "y/o" debe interpretarse como la divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por tanto, el término "y/o" tal como se utiliza en una frase tal como "A y/o B" en la presente pretende incluir "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). De modo similar, el término "y/o", según se utiliza en una frase tal como "A, B y/o C", pretende incluir cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

A menos que se defina de otro modo, todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que interpreta comúnmente un experto en la técnica a la que se refiere esta divulgación. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2.^a ed., 2002, CRC Press; el Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3.^a ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta divulgación.

Las unidades, los prefijos y los símbolos se indican con su forma aceptada por el Sistema Internacional de

Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxilo.

5 Los encabezados que se proporcionan en la presente no son limitaciones de los diversos aspectos de la divulgación, que pueden considerarse por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más detalladamente
10 por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

Siempre que se describan aspectos con la expresión "que comprende", también se proporcionarán aspectos por lo demás análogos descritos en términos de "constituido por" y/o "constituido esencialmente por".

15 En la presente, se hace referencia a los aminoácidos mediante sus símbolos de tres letras conocidos habitualmente o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. De modo similar, se hace referencia a los nucleótidos mediante sus
20 códigos de una única letra aceptados habitualmente.

El término "LOX1" y la expresión "receptor 1 de lipoproteínas de baja densidad oxidadas de tipo lectina" se utilizan indistintamente en la presente y se refieren a LOX1 y/o fragmentos activos desde un punto de vista biológico de
25 LOX1. El ADNc y las secuencias de aminoácidos de tres isoformas de hLOX1 se proporcionan en los n.ºs de acceso GenBank: NP_002534.1, NP_001166103.1 y NP_001166104.1, y cada uno de los cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

30 Los términos "inhibir", "bloquear", "reducir" y "suprimir" se usan indistintamente en la presente y se

refieren a cualquier disminución significativa desde el punto de vista estadístico de la actividad biológica, incluido el bloqueo total de la actividad. Por ejemplo, la "inhibición" se puede referir a una disminución de

5 aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o un 100% de la actividad biológica de LOX1. En consecuencia, cuando los términos "inhibición" o "supresión" se aplican para describir, por ejemplo, un efecto en una ruta de transducción de señales mediada por

10 LOX1 en una célula que expresa LOX1 en la superficie celular (por ejemplo, una célula endotelial, una célula del músculo liso, un macrófago y un trombocito) y en presencia de un ligando de LOX1 (por ejemplo, oxLDL, CRP y AGE), los términos se refieren a la capacidad de una proteína de unión a LOX1,

15 por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1, para disminuir una transducción de señales inducida mediada por LOX1 en la célula en una magnitud significativa desde el punto de vista estadístico (por ejemplo, con un valor p igual o inferior a 0.05). En algunos aspectos, la ruta de transducción de

20 señales mediada por LOX1 es un miembro seleccionado entre RhoA/Rac1, monóxido de nitrógeno, p38MAPK, proteína cinasa B y C, ERK1/2 y/o NF κ B. En aspectos adicionales, la actividad biológica mediada por LOX1 que se inhibe o bloquea es la muerte celular programada (es decir, la apoptosis). En

25 realizaciones adicionales, la actividad biológica mediada por LOX1 que disminuye, se inhibe o se bloquea es la actividad de la caspasa 8 o de la caspasa 9 que aumenta y/o BAX que disminuye. La célula que expresa LOX1 en la superficie celular puede ser una célula con un origen natural

30 (por ejemplo, células endoteliales humanas, células de músculo liso y macrófago), una célula de una línea celular

o una célula recombinante generada introduciendo un ácido nucleico que codifica LOX1 en la célula hospedadora.

Los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina", utilizados indistintamente en la presente, incluyen anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno o cadenas individuales de estos. Un anticuerpo típico comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (que se abrevia en la presente como VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (que se abrevia en la presente como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones de VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de armazón (FW, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FW, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos hospedadores, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Los

anticuerpos a modo de ejemplo de la presente divulgación incluyen anticuerpos típicos, scFv, y combinaciones de estos donde, por ejemplo, un scFv está unido covalentemente (por ejemplo, mediante enlaces peptídicos o mediante un conector
5 químico) al extremo N de la cadena pesada y/o la cadena ligera de un anticuerpo típico, o intercalado en la cadena pesada y/o la cadena ligera de un anticuerpo típico.

El término "anticuerpo" se puede referir a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a
10 una diana, tal como una proteína, un polipéptido, un péptido, un carbohidrato, un polinucleótido, un lípido, o combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento del antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. El término "anticuerpo"
15 incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpo recombinantes, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de anticuerpos de estos.

El término "anticuerpo" engloba anticuerpos
20 policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), mutantes de Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos multiespecíficos, tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos
25 intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación antigénica de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno en tanto
30 que los anticuerpos muestren la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases

principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de estas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basándose en la identidad de sus dominios constantes de la cadena pesada denominados α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc.

El término "germinar" significa que los aminoácidos en posiciones específicas en un anticuerpo se mutan para que sean los aminoácidos que estaban presentes en esa posición en la línea germinal.

La expresión "fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo" o "fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes de la complementariedad de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, sin carácter limitante, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En la divulgación, se proporcionan además fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos, donde el fragmento del anticuerpo es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv, un diacuerpo o una molécula de anticuerpo monocatenaria.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogénea que participa en el reconocimiento y la unión sumamente específicos de un único determinante

antigénico o epítipo. Esto se distingue de los anticuerpos policlonales que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término "anticuerpo monoclonal" engloba anticuerpos monoclonales tanto intactos como de longitud completa así como también fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), mutantes monocatenarios (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno. Además, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a tales anticuerpos producidos de varias maneras que incluyen, sin carácter limitante, mediante hibridoma, selección en fago, expresión recombinante y animales transgénicos.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo derivado de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, murina), que se ha manipulado para que contenga secuencias no humanas mínimas (por ejemplo, murinas). Normalmente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que se reemplazan residuos de la región determinante de la complementaridad (CDR) por residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo o hámster) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)). En algunos casos, los residuos de la región de armazón (FW) Fv de una inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos correspondientes de un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

Los anticuerpos humanizados puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de residuos adicionales en las regiones de armazón Fv y/o en los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad de los anticuerpos. En general, los anticuerpos humanizados comprenderán sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos o tres, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR serán las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante o dominio (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos utilizados para generar anticuerpos humanizados se describen en las patentes de EE. UU. N.ºs 5 225 539 o 5 639 641.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea solas o combinadas. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera están constituidas cada una por cuatro regiones de armazón (FW) conectadas por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas y muy próximas mediante las regiones FW y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) una estrategia basada en la variabilidad de

secuencia entre especies (es decir, Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5.^a ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); y (2) una estrategia basada en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani *et al.*, *J. Molec. Biol.* 273:927-948 (1997)). Además, a veces se utilizan combinaciones de estas dos estrategias en la técnica para determinar CDR.

Generalmente, se utiliza el sistema de numeración de Kabat cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente, los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) incorporada a la presente a modo de referencia). La numeración de la posición del aminoácido según Kabat se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de la cadena pesada o los dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de una FW o CDR del dominio variable o una inserción en esta. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir una inserción de un único aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, los residuos 82a, 82b y 82c, etc.

según Kabat) después del residuo 82 de la FW de la cadena pesada.

La numeración de Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo concreto mediante alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia con numeración de Kabat "convencional". Chothia se refiere en su lugar a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). El final del bucle CDR-H1 de Chothia cuando se numera utilizando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat sitúa las inserciones en H35A y H35B; si no está presente ni 35A ni 35B, el bucle termina en 32; si únicamente está presente 35A, el bucle termina en 33; si están presentes tanto 35A como 35B, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un término intermedio entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se utilizan mediante software de modelización de anticuerpos AbM de Oxford Molecular.

IMGT (ImMunoGeneTics) también proporciona un sistema de numeración para las regiones variables de inmunoglobulina, incluyendo las CDR. Remítase a, por ejemplo, Lefranc, M.P. *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27: 55-77(2003), que se incorpora a la presente a modo de referencia. El sistema de numeración de IMGT se basó en una alineación de más de 5000 secuencias, datos estructurales y caracterización de bucles hipervariables y permite una fácil comparación de las regiones variables y CDR para todas las especies. Según el esquema de numeración de IMGT la CDR1-VH está en las posiciones 26 a 35, la CDR2-VH está en las posiciones 51 a

57, la CDR3-VH está en las posiciones 93 a 102, la CDR1-VL está en las posiciones 27 a 32, la CDR2-VL está en las posiciones 50 a 52 y la CDR3-VL está en las posiciones 89 a 97.

5 Tal como se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva las secuencias de las CDR de la VH descritas corresponden a las ubicaciones de la numeración de Kabat clásica, concretamente CDR1-VH está en las posiciones 31-35, CDR2-VH está en las posiciones 50-65 y CDR3-VH está en las posiciones
10 95-102. La CDR1-VL, la CDR2-VL y la CDR3-VL también corresponden a las ubicaciones de la numeración de Kabat clásica, concretamente las posiciones 24-34, 50-56 y 89-97, respectivamente.

La expresión "anticuerpo humano" se refiere a un
15 anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un ser humano preparada utilizando cualquier técnica conocida en la materia. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o
20 completos, fragmentos de estos y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de la cadena pesada y/o ligera humana tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de la cadena pesada humana y cadena ligera murina.

25 La expresión "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Normalmente, la región variable de ambas cadenas ligera y pesada corresponde a la región variable de anticuerpos
30 derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad

deseadas mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otra especie (habitualmente humana) para evitar provocar una respuesta inmunitaria en esa especie.

5 El término "TM" o la expresión "mutante TM" se refiere a una mutación en la región constante de la IgG1 que da como resultado un descenso de la función efectora (por ejemplo, ADCC) de un anticuerpo que tiene la mutación. Un mutante TM comprende una combinación de tres mutaciones
10 L234F/L235E/P331S que da como resultado una IgG1 humana con la función efectora anulada (numeración EU Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Servicio de Salud Pública de EE. UU., Institutos Nacionales de Salud, Washington, D.C.), introducida en la cadena pesada
15 de una IgG1.

El término "YTE" o la expresión "mutante YTE" se refiere a una mutación en el Fc de la IgG1 que da como resultado un aumento de la unión al FcRn humano y mejora la semivida sérica del anticuerpo que tiene la mutación. Un mutante YTE
20 comprende una combinación de tres mutaciones M252Y/S254T/T256E (numeración EU Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Servicio de Salud Pública de EE. UU., Institutos Nacionales de Salud, Washington, D.C.), introducida en la cadena pesada de una
25 IgG1. Remítase a la Patente de EE. UU. N.º 7 658 921, que se incorpora a la presente a modo de referencia. Se ha observado que el mutante YTE aumenta la semivida sérica de los anticuerpos aproximadamente cuatro veces en comparaciones con las versiones naturales del mismo anticuerpo (Dall'Acqua
30 *et al.*, *J. Biol. Chem.* 281:23514-24 (2006)). Remítase también

a la patente de EE. UU. N.º 7 083 784 que se incorpora a modo de referencia a la presente en su totalidad.

Las expresiones "proteína de unión a LOX1", "anticuerpo contra LOX1" o "un anticuerpo que se une específicamente a LOX1" se refieren a una proteína de unión a LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 que es capaz de unirse a LOX1 con una afinidad suficiente para que el anticuerpo sea útil como un agente terapéutico o un reactivo diagnóstico que tenga LOX1 como diana. El grado de unión de un anticuerpo contra LOX1 a una proteína que no sea LOX1, no relacionada es inferior a aproximadamente un 10% de la unión del anticuerpo a LOX1 tal como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), BIACORE™ (utilizando LOX1 recombinante como analito y el anticuerpo como ligando, o viceversa), un ensayo de exclusión cinético (KINEXA®) u otros ensayos de unión conocidos en la técnica. En ciertos aspectos, la proteína de unión a LOX1 es un anticuerpo completo o un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo que tiene una constante de disociación (KD) que es ≤ 1 nM, ≤ 0.5 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 10 pM o ≤ 1 pM, o en algunos casos, una KD de aproximadamente 150 pM a aproximadamente 600 pM o de aproximadamente 400 pM a aproximadamente 600 pM. En ciertos aspectos, la proteína de unión a LOX1 es un anticuerpo completo o un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo que tiene una constante de disociación (KD) que es ≤ 1 μ M, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 10 pM, ≤ 1 pM o ≤ 0.1 pM, o en algunos casos, una KD de aproximadamente 150 pM a aproximadamente 600 pM.

Un "antagonista" o una proteína de unión a LOX1 "de bloqueo" es el que inhibe o reduce la actividad biológica de LOX1. En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 antagonista inhibe la capacidad de LOX1 de unirse a oxLDL,

AGE y/o CRP. En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 inhibe la capacidad de LOX1 de unirse a oxHDL, HSP60, leucocitos y/o trombocitos activados. En ciertos aspectos, una proteína de unión a LOX1 inhibe sustancial o
5 completamente la actividad biológica de LOX1. De manera deseable, la actividad biológica de LOX1 se reduce en un 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% o incluso en un 100%. En aspectos particulares, la proteína de unión a LOX1 es un anticuerpo contra LOX1, tal como un anticuerpo completo o un
10 fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo. En aspectos adicionales, el anticuerpo contra LOX1 inhibe o reduce la actividad biológica de LOX1 en un 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% o incluso un 100%.

Generalmente, la "afinidad de unión" se refiere a la
15 fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza en la presente, la "afinidad de unión" se refiere a
20 afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y puede representarse generalmente mediante la constante de disociación (K_D). Puede medirse la afinidad mediante métodos
25 comunes conocidos en la técnica, incluidos los descritos en la presente. Los anticuerpos con una baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos con una alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y
30 tienden a permanecer unidos más tiempo. En la técnica se conocen varios métodos para medir la afinidad de unión, y

cualquiera de los cuales puede utilizarse para los fines de la presente divulgación.

La "potencia" se expresa normalmente como un valor de CI_{50} , en nM o pM a menos que se afirme lo contrario. La CI_{50} es la mediana de la concentración inhibidora de una molécula de un anticuerpo. En los ensayos funcionales, la CI_{50} es la concentración que reduce una respuesta biológica al 50% de su máximo. En estudios de unión de ligando, la CI_{50} es la concentración que reduce la unión al receptor al 50% del nivel de unión específico máximo. Puede calcularse la CI_{50} mediante medios conocidos en la técnica.

El factor de mejora de la potencia para la proteína de unión a LOX1 divulgada en la presente (por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo y variantes y derivados de estos) en comparación con un anticuerpo de referencia puede ser de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 110 veces, al menos aproximadamente 120 veces, al menos aproximadamente 130 veces, al menos aproximadamente 140 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 160 veces, al menos aproximadamente 170 veces o al menos aproximadamente 180 veces o más.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual la Ig secretada unida a los receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, 5 linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta el antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos IgG con elevada afinidad 10 específicos dirigidos a la superficie de células diana "arman" las células citotóxicas y se requieren de manera esencial para tal destrucción. La lisis de la célula diana es extracelular, requiere contacto directo entre las células y en ella no participa el complemento. Se contempla que, 15 además de anticuerpos, otras proteínas que comprenden regiones Fc, específicamente proteínas de fusión con Fc, que tienen la capacidad para unirse específicamente a una célula diana que porta el antígeno podrán efectuar la citotoxicidad mediada por células. Por simplicidad, la citotoxicidad 20 mediada por células resultado de la actividad de una proteína de fusión con Fc también se denomina en la presente actividad ADCC.

Una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1, incluido un fragmento de unión al antígeno, 25 variante y derivado de este), polinucleótido, vector, célula o composición que se "aísle" es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos contra LOX1 incluidos anticuerpos 30 completos y fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos), polinucleótido, vector, polinucleótidos, vectores, células

o composiciones aislados incluyen los que se han purificado en un grado que ya no están en una forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunos aspectos, un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que
5 está aislado está sustancialmente puro.

El término "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" se refiere a cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, al cual se desea aplicar un diagnóstico, pronóstico o terapia. Los sujetos mamíferos
10 incluyen seres humanos, animales de compañía, animales de granja, animales de competición y animales de zoológicos, incluidos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, osos y así sucesivamente.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a un preparado que está en tal forma que permite que la actividad biológica del principio activo (por ejemplo, una proteína de unión a LOX1 divulgada en la presente) sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente
15 tóxicos para un sujeto al que se administrará la composición. Dicha composición puede ser estéril.

Una "cantidad eficaz" o una "cantidad eficaz desde un punto de vista farmacéutico" de una proteína de unión a LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1, u otro agente
25 terapéutico, es una cantidad suficiente para llevar a cabo un objetivo que se ha establecido específicamente. Puede determinarse una "cantidad eficaz" empíricamente y de manera rutinaria, en relación con el fin establecido. En la divulgación se proporcionan agentes terapéuticos para
30 tratar, prevenir o mejorar enfermedades y afecciones asociadas con LOX1 y/o un descenso de la señalización mediada

por HDL. Estas enfermedades y afecciones incluyen, por ejemplo, aterosclerosis, trombosis, CAD, isquemia (por ejemplo, isquemia de miocardio), infarto (por ejemplo, infarto de miocardio), síndrome coronario agudo (ACS),
5 accidente cerebrovascular, lesión por reperfusión, reestenosis, enfermedad vascular periférica, hipertensión, insuficiencia cardíaca, inflamación (por ejemplo, inflamación crónica), angiogénesis, preeclampsia y cáncer.

El término "marca" cuando se utiliza en la presente se
10 refiere a un compuesto o una composición detectable que está conjugado directa o indirectamente con un anticuerpo de manera que genera un anticuerpo "marcado". La marca puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, marcas radioisotópicas o marcas fluorescentes) o, en el caso de una
15 marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o una composición de sustrato que es detectable.

Los términos tales como "que trata" o "tratamiento" o "tratar" o "que alivia" o "aliviar" se refieren tanto a (1) medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen
20 estados asociados con una enfermedad o afección diagnosticada y/o que detienen su evolución como a (2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o retrasan el desarrollo de una enfermedad o afección diana. Por tanto, los que necesitan el tratamiento incluyen los que
25 ya padecen la enfermedad o afección; los que están en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección; y aquellos en los cuales se va a prevenir la enfermedad o afección. En ciertos aspectos, un sujeto se "ha tratado" con éxito de acuerdo con los métodos que se proporcionan en la presente si el sujeto
30 muestra, por ejemplo, una mejora o eliminación total, parcial o transitoria de un síntoma asociado con la enfermedad o

afección. Tales enfermedades o afecciones incluyen, por ejemplo, aterosclerosis, trombosis, CAD, isquemia (por ejemplo, isquemia de miocardio), infarto (por ejemplo, infarto de miocardio), síndrome coronario agudo (ACS),
5 accidente cerebrovascular, lesión por reperfusión, reestenosis, enfermedad vascular periférica, hipertensión, insuficiencia cardíaca, inflamación (por ejemplo, inflamación crónica), angiogénesis, preeclampsia y cáncer.

Un "ácido nucleico" o "polinucleótido", tal como se
10 utiliza en la presente, puede incluir uno o más "polinucleótidos", "moléculas polinucleotídicas" o "secuencias polinucleotídicas", y se refiere a un polímero de nucleótidos de cualquier longitud e incluye ADN (genómico o ADNc) y ARN. Los ácidos nucleicos pueden ser
15 desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que la ADN o ARN polimerasa pueda incorporar a un polímero. Un "ácido nucleico" o un "polinucleótido" puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y
20 sus análogos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en la presente, incluidos ARN y ADN (genómico o ADNc).

El término "vector" se refiere a un constructo, que es capaz de suministrar, y en algunos aspectos, expresar, uno
25 o más genes o secuencias de interés en una célula hospedadora. Los ejemplos de vectores incluyen, sin carácter limitante, vectores virales, vectores de expresión de ARN o ADN desnudo, plásmidos, vectores de cósmido o fago, vectores de expresión de ARN o ADN asociados con agentes de
30 condensación catiónicos, vectores de expresión de ARN o ADN

encapsulados en liposomas, y ciertas células eucariotas, tales como células productoras.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente para referirse a
5 polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por elementos que no son aminoácidos. Los términos también engloban un polímero de aminoácidos que se ha modificado de manera natural o
10 mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También están incluidos en la definición, por ejemplo, los
15 polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como también otras modificaciones conocidas en la técnica. Se sobreentiende que, dado que los polipéptidos de esta divulgación se basan en anticuerpos, en
20 ciertos aspectos, los polipéptidos pueden aparecer como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

Los términos "idéntico" o "identidad" secuencial porcentual en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o proteínas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias
25 que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de residuos nucleotídicos o aminoacídicos que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo huecos, si es necesario) para lograr la máxima correspondencia, sin considerar cualesquiera sustituciones conservadoras de
30 aminoácidos como parte de la identidad secuencial. La identidad porcentual se puede medir utilizando algoritmos o

un software de comparación de secuencias o mediante inspección visual. En la técnica se conocen diversos algoritmos y software que se pueden utilizar para obtener alineaciones de secuencias de aminoácidos o nucleótidos.

5 Uno de tales ejemplos no limitantes de un algoritmo de alineación de secuencias es el algoritmo descrito en Karlin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268 (1990), modificado según Karlin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5873-5877 (1993) e incorporado en los programas NBLAST y
10 XBLAST (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1991)). En ciertos aspectos, se puede utilizar BLAST con huecos tal como se describe en Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997), BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)), ALIGN,
15 ALIGN-2 (Genentech, San Francisco Sur, California) o Megalign (DNASTAR) son programas de software adicionales de disposición pública que se pueden utilizar para alinear secuencias. En ciertos aspectos, la identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos se determina utilizando
20 el programa GAP en el paquete de software GCG (por ejemplo, utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso del hueco de 40, 50, 60, 70 o 90 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6). En ciertos aspectos alternativos, el programa GAP del paquete de software GCG, que incorpora el algoritmo de
25 Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) se puede utilizar para determinar la identidad porcentual entre dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo, utilizando una matriz BLOSUM 62 o una matriz PAM250 y un peso del hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de la longitud de 1, 2,
30 3, 4 o 5). Como alternativa, en ciertos aspectos, la identidad porcentual entre las secuencias de nucleótidos o

aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Myers y Miller (*CABIOS*, 4:11-17 (1989)). Por ejemplo, la identidad porcentual se puede determinar utilizando el programa ALIGN (versión 2.0) y utilizando PAM120 con una Tabla de residuos, una penalización por la longitud del hueco de 12 y una penalización por el hueco de 4. Un experto en la técnica puede determinar los parámetros apropiados para la alineación máxima según un software de alineación concreto. En ciertos aspectos, se utilizan los parámetros predeterminados del software de alineación.

En ciertos aspectos, la identidad secuencial porcentual "X" de una primera secuencia de aminoácidos respecto a una segunda secuencia de aminoácidos se calcula como $100 \times (Y/Z)$, donde Y es el número de residuos aminoacídicos puntuados como coincidencias idénticas en la alineación de la primera y la segunda secuencias (tal como se alinean mediante inspección visual o un programa de alineación de secuencias particular) y Z es el número total de residuos en la segunda secuencia. Si la longitud de una primera secuencia es mayor que la de la segunda secuencia, la identidad porcentual de la primera secuencia respecto a la segunda secuencia será mayor que la identidad porcentual de la segunda secuencia respecto a la primera secuencia.

Una "sustitución de aminoácido conservadora" es una en la que se reemplaza un residuo aminoacídico con otro residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. En la técnica, se han definido familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares, incluidas las cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina e histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico), cadenas laterales polares no

cargadas (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina y cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano), cadenas laterales β -ramificadas (por ejemplo, treonina, valina e isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. En ciertos aspectos, las sustituciones conservadoras en las secuencias de las proteínas de unión a LOX1 de la divulgación no anulan la unión a LOX1 de la proteína que contiene la secuencia de aminoácidos sustituida. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno son muy conocidos en la técnica (remítase a, por ejemplo, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-1 187 (1993); Kobayashi *et al.*, *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); y Burks *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

El término "epítipo" tal como se utiliza en la presente se refiere a un determinante proteico de LOX1, por ejemplo, LOX1 humano (hLOX1) o LOX1 de mono (por ejemplo, mono cinomolgo), capaz de unirse a una proteína que de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo) de la divulgación. Normalmente, los epítipos están constituidos por agrupaciones superficiales activas desde un punto de vista químico de moléculas tales como cadenas laterales de azúcares o aminoácidos y normalmente tienen unas características estructurales tridimensionales específicas, así como también unas características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se diferencian en que

la unión a los primeros, pero no a los segundos, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. Tales proteínas de unión a LOX1 se pueden identificar en función de su capacidad para competir de manera cruzada (por ejemplo, para inhibir de manera competitiva la unión, de manera significativa desde un punto de vista estadístico) con anticuerpos que comprenden, por ejemplo, una secuencia de VH de la SEQ ID NO:4 y una secuencia de VL de la SEQ ID NO:33, o una secuencia de VH de la SEQ ID NO:41 y una secuencia de VL de la SEQ ID NO:58 en ensayos de actividad o de unión al antígeno estándar.

Se dice que una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo) "compite" con una molécula de referencia por la unión a LOX1 si se une a LOX1 en la misma medida en que bloquea, en cierto grado, la unión de la molécula de referencia a LOX1. La capacidad de las proteínas para competir por la unión a LOX1 se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica incluido, por ejemplo, un ensayo ELISA competitivo. Tal como se utiliza en la presente, se puede decir que una molécula de unión a LOX1 inhibe de manera competitiva la unión de la molécula de referencia a LOX1, por ejemplo, en al menos un 90%, al menos un 80%, al menos un 70%, al menos un 60% o al menos un 50%.

II. Proteínas de unión a LOX1

En la presente divulgación se proporcionan proteínas de unión a LOX1 que se unen de manera específica a LOX1. En algunos aspectos, una proteína de unión a LOX1 es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, y una variante y derivado de estos. En aspectos adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo

recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico o un fragmento de un anticuerpo de estos. En ciertos aspectos, el anticuerpo
5 contra LOX1 es un anticuerpo completo.

En algunos aspectos, el anticuerpo contra LOX1 es un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo. En algunos aspectos, el fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo es un: Fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, diacuerpo o una
10 molécula de un anticuerpo monocatenaria. En aspectos adicionales, el anticuerpo contra LOX1 es un Fd, Fv(scFv) monocatenario, Fv unido con disulfuros, dominio V-NAR, IgNar, intracuerpo, IgΔCH2, minicuerpo, F(ab')₃, tetracuerpo, triacuerpo, diacuerpo, anticuerpo con un único
15 dominio, DVD-Ig, Fcab, mAb², (scFv)₂ o un scFv-Fc.

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 es un anticuerpo que incluye una VH y una VL. En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) incluye además
20 una región constante de la cadena pesada o un fragmento de esta. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región constante de inmunoglobulina de la cadena pesada seleccionada a partir del grupo constituido por: (a) una región constante de la IgA humana o un fragmento de esta;
25 (b) una región constante de la IgD humana o un fragmento de esta; (c) un dominio constante de la IgE humana o un fragmento de este; (d) una región constante de la IgG1 humana o un fragmento de esta; (e) una región constante de la IgG2 humana o un fragmento de esta; (f) una región constante de
30 la IgG3 humana o un fragmento de esta; (g) una región constante de la IgG4 humana o un fragmento de esta; y (h)

una región constante de la IgM humana o un fragmento de esta. En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) comprende un dominio constante de inmunoglobulina de la

5 cadena pesada que tienen una actividad ADCC reducida o que se ha mutado para que la tenga. En aspectos particulares, la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG1 que contiene una mutación que

10 disminuye la función efectora. En algunos aspectos, la región constante de la IgG1 comprende una mutación en las posiciones 234, 235 y 331, siendo la numeración de la posición según el índice EU tal como en Kabat. En aspectos adicionales, la región constante de la IgG1 comprende mutaciones triples

15 L234F/L235E/P331S (TM), siendo la numeración de la posición según el índice EU tal como en Kabat, lo que da como resultado una IgG1 humana con la función efectora anulada. En algunos aspectos, la región constante de la IgG1 comprende el mutante YTE con la mutación triple, tal como se ha descrito

20 anteriormente en la sección "Definiciones". En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 es un anticuerpo que contiene una región constante de la IgG1 que comprende tanto la mutación triple TM como la mutación triple YTE.

En ciertos aspectos, una región constante de la cadena

25 pesada o un fragmento de esta, por ejemplo, una región constante de la IgG humana o un fragmento de esta, puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos respecto a un dominio constante de la IgG natural, donde la IgG modificada tiene una semivida mayor en comparación con la semivida de

30 una IgG que tiene el dominio constante de la IgG natural. Por ejemplo, el dominio constante de la IgG puede contener

una o más sustituciones de aminoácidos en los residuos aminoacídicos de las posiciones 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, siendo la numeración de la posición del aminoácido según el índice EU tal como se expone en Kabat.

5 En ciertos aspectos, el dominio constante de la IgG puede contener una o más de: una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 252 por Tirosina (Y), fenilalanina (F), triptófano (W) o treonina (T), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 254 por treonina (T), una sustitución
10 del aminoácido en la posición Kabat 256 por serina (S), arginina (R), glutamina (Q), ácido glutámico (E), ácido aspártico (D) o treonina (T), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 257 por leucina (L), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 309 por Prolina (P), una
15 sustitución del aminoácido en la posición Kabat 311 por Serina (S), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 428 por treonina (T), leucine (L), fenilalanina (F) o serina (S), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 433 por arginina (R), serina (S), isoleucina (I),
20 prolina (P) o glutamina (Q) o una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 434 por triptófano (W), metionina (M), serina (S), histidina (H), fenilalanina (F) o tirosina. De manera más específica, el dominio constante de la IgG puede contener sustituciones de aminoácidos respecto a un dominio
25 constante de la IgG humana natural que incluye una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 252 por tirosina (Y), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 254 por treonina (T) y una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 256 por ácido glutámico (E).

30 En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de

este) comprende un dominio constante de inmunoglobulina de la cadena ligera seleccionado a partir del grupo constituido por: (a) un dominio constante κ de la Ig humana; y (b) un dominio constante λ de la Ig humana. En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) comprende un dominio constante de la IgG1 de la cadena pesada humana que contiene las mutaciones triples L234F/L235E/P331S ("IgG-TM") lo que da como resultado una IgG1 humana con la función efectora anulada y un dominio constante λ de la cadena ligera humana.

En la divulgación se proporciona una proteína de unión a LOX1 aislada que comprende una VH y/o una VL que tiene un total de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos respecto a una VH o VL de referencia descrita en la presente. En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 tiene una VH y/o VL tal como se muestra en la Tabla 1.

En la Tabla 1 se proporcionan proteínas de unión a LOX-1 a modo de ejemplo.

Tabla 1: Proteínas de unión a LOX-1 a modo de ejemplo

Lox514	
CDR1 de VH	ELSMH (SEQ ID NO:1)
CDR2 de VH	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO:5)
CDR3 de VH	PNGQQGKGVRGWDYYYGMDV (SEQ ID NO:14)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE WMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDTA VYYCATPNGQQGKGVRGWDYYYGMDVWGRGTTVTVSS (SEQ ID NO:29)
CDR1 de VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO:30)

5	CDR2 de VL	GNSNRPS (SEQ ID NO:31)
	CDR3 de VL	QSYDSSLSGWV (SEQ ID NO:32)
	VL	QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAP KLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQS YDSSLSGWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:33)
	LX5140011	
	CDR1 de VH	ELSMH (SEQ ID NO:1)
10	CDR2 de VH	GFDPEDWEYAYDQKFQG (SEQ ID NO:6)
	CDR3 de VH	PNGQQGKGVRGWDYYYGMDV (SEQ ID NO:14)
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE WMGGFDPEDWEYAYDQKFQGRVTMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDTA VYYCATPNGQQGKGVRGWDYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:19)
15	CDR1 de VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO:30)
	CDR2 de VL	GNSNRPS (SEQ ID NO:31)
	CDR3 de VL	QSYDSSLSGWV (SEQ ID NO:32)
20	VL	QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAP KLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQS YDSSLSGWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:33)
	LX5140014	
	CDR1 de VH	ELSMH (SEQ ID NO:1)
25	CDR2 de VH	GFDPEDYTIRVGQKFQG (SEQ ID NO:7)
	CDR3 de VH	PNGQQGKGVRGWDYYYGMDV (SEQ ID NO:14)
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE WMGGFDPEDYTIRVGQKFQGRVTMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDTA VYYCATPNGQQGKGVRGWDYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:20)
30	CDR1 de VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO:30)

5	CDR2 de VL	GNSNRPS (SEQ ID NO:31)
	CDR3 de VL	QSYDSSLSGWV (SEQ ID NO:32)
	VL	QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAP KLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQS YDSSLSGWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:33)
	LX5140016	
	CDR1 de VH	ELSMH (SEQ ID NO:1)
10	CDR2 de VH	GFDPEDWQTHTAQKFQG (SEQ ID NO:8)
	CDR3 de VH	PNGQQGKGVRGWDYYYGMDV (SEQ ID NO:14)
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE WMGGFDPEDWQTHTAQKFQGRVTMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDTA VYYCATPNGQQGKGVRGWDYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:21)
15	CDR1 de VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO:30)
	CDR2 de VL	GNSNRPS (SEQ ID NO:31)
	CDR3 de VL	QSYDSSLSGWV (SEQ ID NO:32)
20	VL	QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAP KLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQS YDSSLSGWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:33)
	LX5140038	
	CDR1 de VH	ELSMH (SEQ ID NO:1)
	CDR2 de VH	GFDPEDWTIHVDQKFQG (SEQ ID NO:9)
	CDR3 de VH	PNGQQGKGVRGWDYYYGMDV (SEQ ID NO:14)
25	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE WMGGFDPEDWTIHVDQKFQGRVTMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDTA VYYCATPNGQQGKGVRGWDYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:22)
	CDR1 de VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO:30)
	CDR2 de VL	GNSNRPS (SEQ ID NO:31)
30		

5	CDR3 de VL	QSYDSSLSGWV (SEQ ID NO:32)
	VL	QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAP KLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQS YDSSLSGWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:33)
	LX5140094	
	CDR1 de VH	ELSMH (SEQ ID NO:1)
	CDR2 de VH	GFDPEDWQYHVSQKFQG (SEQ ID NO:10)
10	CDR3 de VH	PNGQQGKGVRGWDYYYGMDV (SEQ ID NO:14)
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE WMGGFDPEDWQYHVSQKFQGRVTMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDYA VYYCATPNGQQGKGVRGWDYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:23)
	CDR1 de VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO:30)
	CDR2 de VL	GNSNRPS (SEQ ID NO:31)
	CDR3 de VL	QSYDSMYRFG (SEQ ID NO:34)
20	VL	QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAP KLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQS YDSMYRFG FGGGTKLTVL (SEQ ID NO:36)
	LX5140108	
	CDR1 de VH	ELSMH (SEQ ID NO:1)
	CDR2 de VH	GFDPEDWSNHVSQKFQG (SEQ ID NO:11)
	CDR3 de VH	STGRQGKGVRGWDYYYGMDV (SEQ ID NO:15)
25	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE WMGGFDPEDWSNHVSQKFQGRVTMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDYA VYYCLTSTGRQGKGVRGWDYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:24)
	CDR1 de VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO:30)
	CDR2 de VL	GNSNRPS (SEQ ID NO:31)
	CDR3 de VL	QSYDSMYRFG (SEQ ID NO:34)
	VL	QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAP KLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQS YDSMYRFG FGGGTKLTVL (SEQ ID NO:36)
30	CDR1 de VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO:30)
	CDR2 de VL	GNSNRPS (SEQ ID NO:31)
	CDR3 de VL	QSYDSMYRFG (SEQ ID NO:34)
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE WMGGFDPEDWSNHVSQKFQGRVTMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDYA VYYCLTSTGRQGKGVRGWDYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:24)
	VL	QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAP KLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQS YDSMYRFG FGGGTKLTVL (SEQ ID NO:36)

5	CDR3 de VL	QSYDSSLSGWV (SEQ ID NO:32)
	VL	QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAP KLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQS YDSSLSGWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:33)
	LX5140110	
	CDR1 de VH	ELSMH (SEQ ID NO:1)
	CDR2 de VH	GFDPEDFKYHTHQKFQG (SEQ ID NO:2)
10	CDR3 de VH	VWGTQKGKVRGWDYYYGMDV (SEQ ID NO:3)
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE WMGGFDPEDFKYHTHQKFQGRVTMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDTA VYYCALVWGTQKGKVRGWDYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:4)
	CDR1 de VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO:30)
	CDR2 de VL	GNSNRPS (SEQ ID NO:31)
	CDR3 de VL	QSYDSSLSGWV (SEQ ID NO:32)
20	VL	QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAP KLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQS YDSSLSGWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:33)
	LX5140092	
	CDR1 de VH	ELSMH (SEQ ID NO:1)
	CDR2 de VH	GFDPEDWKYHLSQKFQG (SEQ ID NO:12)
	CDR3 de VH	PNGTHQGGVRGWDYYYGMDV (SEQ ID NO:17)
25	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE WMGGFDPEDWKYHLSQKFQGRVTMTEDTSTDYAYMELSSLRSEDTA VYYCATPNGTHQGGVRGWDYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:26)
	CDR1 de VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO:30)
	CDR2 de VL	GNSNRPS (SEQ ID NO:31)
	CDR3 de VL	QSYDSSLSGWV (SEQ ID NO:32)
30		

5	VL	QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAP KLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQS YDSSLSGWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:33)
	LX5140092 _D	
	CDR1 de VH	ELSMH (SEQ ID NO:1)
	CDR2 de VH	GFDPEDWKYHLSQKFQG (SEQ ID NO:12)
	CDR3 de VH	PDGTHQGGVRGWDYYYGMDV (SEQ ID NO:16)
10	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE WMGGFDPEDWKYHLSQKFQGRVTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDTA VYYCATPDGTHQGGVRGWDYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:25)
15	CDR1 de VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO:30)
	CDR2 de VL	GNSNRPS (SEQ ID NO:31)
	CDR3 de VL	QSYDSSLSGWV (SEQ ID NO:32)
20	VL	QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAP KLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQS YDSSLSGWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:33)
	LX5140093	
	CDR1 de VH	ELSMH (SEQ ID NO:1)
	CDR2 de VH	GFDPEDWAYHQAQKFQG (SEQ ID NO:13)
	CDR3 de VH	PNGQQGKGVRGWDYYYGMDV (SEQ ID NO:14)
25	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE WMGGFDPEDWAYHQAQKFQGRVTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDTA VYYCATPNGQQGKGVRGWDYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:27)
30	CDR1 de VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO:30)
	CDR2 de VL	GNSNRPS (SEQ ID NO:31)
	CDR3 de VL	QSYDSSHRAWA (SEQ ID NO:35)

5	VL	QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAP KLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQS YDSSHRAWAFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:37)
	LX5140093 _D	
	CDR1 de VH	ELSMH (SEQ ID NO:1)
	CDR2 de VH	GFDPEDWAYHQAQKFQG (SEQ ID NO:13)
	CDR3 de VH	PDGQQGKGVRGWDYYYGMDV (SEQ ID NO:18)
10	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE WMGGFDPEDWAYHQAQKFQGRVTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDTA VYYCATPDGQQGKGVRGWDYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:28)
15	CDR1 de VL	TGSSSNIGAGYDVH (SEQ ID NO:30)
	CDR2 de VL	GNSNRPS (SEQ ID NO:31)
	CDR3 de VL	QSYDSSHRAWA (SEQ ID NO:35)
20	VL	QSVVTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAP KLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQS YDSSHRAWAFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:37)
	Lox696	
	CDR1 de VH	DYAMH (SEQ ID NO:38)
	CDR2 de VH	GISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO:39)
	CDR3 de VH	EGNWNDAFDI (SEQ ID NO:44)
25	VH	QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREGNWNDAFDIWRGTTVTVSS (SEQ ID NO:54)
30	CDR1 de VL	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:55)
	CDR2 de VL	DVSNRPS (SEQ ID NO:60)
	CDR3 de VL	SSYTSSSTNWV (SEQ ID NO:61)

5	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSS YTSSSTNWWFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:70)
	LX6960067 _ngl1	
	CDR1 de VH	DYAMH (SEQ ID NO:38)
	CDR2 de VH	GVSLQELYTGADSVKG (SEQ ID NO:42)
	CDR3 de VH	EGSWNYDAFDI (SEQ ID NO:45)
10	VH	QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGVSLQELYTGADSVKGRFTVSGDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREGSWNYDAFDIWGRGTTVTVSS (SEQ ID NO:48)
	CDR1 de VL	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:55)
	CDR2 de VL	DVSNRPS (SEQ ID NO:60)
	CDR3 de VL	LGRTWSSTNWW (SEQ ID NO:62)
15	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCLG RTWSSTNWWFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:65)
	LX6960071 _ngl1	
	CDR1 de VH	DYAMH (SEQ ID NO:38)
	CDR2 de VH	GISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO:39)
	CDR3 de VH	EGNWNDAFDI (SEQ ID NO:44)
20	VH	QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMDSLRAEDTA VYYCAREGNWNDAFDIWGRGTTVTVSS (SEQ ID NO:49)
	CDR1 de VL	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:55)
	CDR2 de VL	DVSNRPS (SEQ ID NO:60)
	CDR3 de VL	MGGMGRSTNWW (SEQ ID NO:57)
	VL	QSALTQPASVSGSPGQPITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCMG SMGRSTNWWFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:66)
30		

5	LX6960073 _ngl1	
	CDR1 de VH	DYAMH (SEQ ID NO:38)
	CDR2 de VH	GISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO:39)
	CDR3 de VH	EGSWNYDALDI (SEQ ID NO:46)
10	VH	QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTSDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNGLRAEDTA VYYCAREGSWNYDALDIWGRGTTVTSS (SEQ ID NO:50)
	CDR1 de VL	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:55)
	CDR2 de VL	DVSKRPS (SEQ ID NO:56)
	CDR3 de VL	MGGMGRSTNWV (SEQ ID NO:57)
15	VL	QSALTQPASVSGSPGPITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAP KLMIYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCMG GMGRSTNWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:67)
	LX6960086 _ngl1	
	CDR1 de VH	DYAMH (SEQ ID NO:38)
	CDR2 de VH	GISWNSPDRYMDDSVKG (SEQ ID NO:43)
20	CDR3 de VH	EGNWNDAFDI (SEQ ID NO:44)
	VH	QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSPDRYMDDSVKGRFTISRDNQNSLYLQMDSLRAEDTA VYYCAREGNWNDAFDIWGRGTTVTSS (SEQ ID NO:51)
	CDR1 de VL	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:55)
	CDR2 de VL	DVSNRPS (SEQ ID NO:60)
25	CDR3 de VL	LGRTWSSTNWV (SEQ ID NO:62)
	VL	QSALTQPASVSGSPQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAP KLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCLG RTWSSTNWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:65)
	LX6960094 _ngl1	

5	CDR1 de VH	DYAMH (SEQ ID NO:38)
	CDR2 de VH	GISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO:39)
	CDR3 de VH	EGNWNDAFDI (SEQ ID NO:44)
	VL	QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREGNWNDAFDIWGRGTTVTSS (SEQ ID NO:54)
	CDR1 de VL	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:55)
10	CDR2 de VL	DVSNRPS (SEQ ID NO:60)
	CDR3 de VL	AQRTVSSTNWV (SEQ ID NO:64)
	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAP KLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCAQ RTVSSTNWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:68)
	LX6960101 _ngl1	
	CDR1 de VH	DYAMH (SEQ ID NO:38)
15	CDR2 de VH	GISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO:39)
	CDR3 de VH	EGNWNDAFDV (SEQ ID NO:47)
	VH	QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREGNWNDAFDVWGRGTTVTSS (SEQ ID NO:52)
	CDR1 de VL	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:55)
	CDR2 de VL	DVSNRPS (SEQ ID NO:60)
20	CDR3 de VL	MGGMGRSTNWV (SEQ ID NO:57)
	VL	QSALTQPASVSGSPGPITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAP KLMIYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCMG GMGRSTNWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:67)
	LX6960102 _ngl1	
	CDR1 de VH	DYAMH (SEQ ID NO:38)
	CDR2 de VH	GISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO:39)
25	CDR3 de VH	EGNWNDAFDI (SEQ ID NO:44)
30		

5	VH	QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREGNWNYDAFDIWGRGTTVTVSS (SEQ ID NO:54)
	CDR1 de VL	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:55)
	CDR2 de VL	DVSNRPS (SEQ ID NO:60)
	CDR3 de VL	MGGMGRSTNWV (SEQ ID NO:57)
10	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSS YTSSSTNWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:70)
	LX6960116 _ngl1	
	CDR1 de VH	DYAMH (SEQ ID NO:38)
	CDR2 de VH	GISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO:39)
15	CDR3 de VH	EGNWNDAFDI (SEQ ID NO:44)
	VH	QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREGNWNYDAFDIWGRGTTVTVSS (SEQ ID NO:54)
	CDR1 de VL	TGTSNDVGGYNYVS (SEQ ID NO:59)
	CDR2 de VL	DVSNRPS (SEQ ID NO:60)
20	CDR3 de VL	SSYTSSSTNWV (SEQ ID NO:61)
	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSTNDVGGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCMG SMGRSTNWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:69)
	LX6960073 _gl	
	CDR1 de VH	DYAMH (SEQ ID NO:38)
25	CDR2 de VH	GISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO:39)
	CDR3 de VH	EGSWNYDALDI (SEQ ID NO:40)
	VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTSDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNLRAEDTA VYYCAREGSWNYDALDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:53)
30		

5	CDR1 de VL	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:55)
	CDR2 de VL	DVSKRPS (SEQ ID NO:56)
	CDR3 de VL	MGGMGRSTNWW (SEQ ID NO:57)
	VL	QSALTQPASVSGSPGQPITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCMG GMGRSTNWWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:58)
LX6960073_G82bS_g1		
10	CDR1 de VH	DYAMH (SEQ ID NO:38)
	CDR2 de VH	GISWNSGSIGYADSVKG (SEQ ID NO:39)
	CDR3 de VH	EGSWNYDALDI (SEQ ID NO:40)
	VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTSDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREGSWNYDALDIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO:41)
15	CDR1 de VL	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:55)
	CDR2 de VL	DVSKRPS (SEQ ID NO:56)
	CDR3 de VL	MGGMGRSTNWW (SEQ ID NO:57)
	VL	QSALTQPASVSGSPGQPITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCMG GMGRSTNWWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:58)
20		

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende una secuencia de VH que tiene un total de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos respecto a una secuencia de VH de referencia de la SEQ ID NO:4. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporciona una proteína de unión a LOX1 aislada que comprende una VH de SEQ ID N0:4. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende una secuencia de VL que tiene un total de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos respecto a una secuencia de VL de referencia de la SEQ ID N0:33. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporciona una proteína de unión a LOX1 aislada que comprende una VL de SEQ ID N0:33. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una VH seleccionada entre una VH que contiene una CDR1-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:1, una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:2, 5-12 o 13, y una CDR3-VH que tiene la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3, 14-17 o 18; y una VL de la cadena ligera seleccionada entre una VL que contiene una CDR1-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30, una CDR2-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31, y una CDR3-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32, 34 o 35. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En la divulgación también se proporciona una proteína de unión a LOX1 aislada que comprende una secuencia de VH y una de VL, teniendo cada una un total de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos respecto a una VH y VL de referencia de proteínas de unión a LOX1 descritas en la presente. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 aislada tiene una VH que comprende la SEQ ID NO: 4, 19-28 o 29, y una VL que comprende la SEQ ID NO:33, 36 o 37. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad (CDR): la CDR1 de la región variable de la cadena pesada (VH), CDR2-VH, CDR3-VH, y la CDR1 de la región variable de la cadena ligera (VL), CDR2-VL y CDR3-VL, donde el conjunto de CDR es idéntico o tiene 18 o menos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18) sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos respecto a un conjunto de referencia de CDR en el que: (a) la CDR1-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; (b) CDR2-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; (c) CDR3-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; (d) CDR1-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30; (e) CDR2-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31; y (f) CDR3-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32. La divulgación también proporciona ácidos nucleicos que codifican una proteína de unión a LOX1, vectores que contienen estos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con estos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para obtener y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende un conjunto de CDR: CDR1-VH, CDR2-VH, CDR3-VH, CDR1-VL, CDR2-VL y CDR3-VL donde: (a) CDR1-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1; (b) CDR2-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2; (c) CDR3-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3; (d) CDR1-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30; (e) CDR2-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31; y (f) CDR3-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la

SEQ ID NO:32. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y
5 vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En la divulgación también se proporciona una proteína de unión a LOX1 aislada que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90, 95, 97, 98
10 o un 99% de identidad secuencial con una secuencia de VH de referencia divulgada en la presente y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90, 95, 97, 98 o un 99% de identidad secuencial con una secuencia de VL de referencia divulgada en la presente (por ejemplo, las
15 secuencias de VH y VL divulgadas en la Tabla 1, la Figura 4 o la Figura 5). En aspectos adicionales, en la divulgación se proporciona una proteína de unión a LOX1 aislada que comprende una VH que tiene al menos un 90, 95, 97, 98 o un 99% de identidad secuencial con la SEQ ID NO:4 y/o una VL
20 que tiene al menos un 90, 95, 97, 98 o un 99% de identidad secuencial con la SEQ ID NO:33. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos
25 nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90, 95, 97, 98 o un 99% de identidad
30 secuencial y una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90, 95, 97, 98 o un 99% de identidad

secuencial con una VH y VL seleccionadas a partir del grupo
constituido por: (a) una VH que tiene la secuencia de
aminoácidos de la SEQ ID N0:4 y una VL que tiene la secuencia
de aminoácidos de la SEQ ID N0:33; (b) una VH que tiene la
5 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:29 y una VL que
tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:33; (c)
una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID
N0:41 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la
SEQ ID N0:58; y (d) una VH que tiene la secuencia de
10 aminoácidos de la SEQ ID N0:54 y una VL que tiene la secuencia
de aminoácidos de la SEQ ID N0:70. En la divulgación también
se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína
de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos
y células hospedadoras transformadas con esos ácidos
15 nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la
proteína de unión a LOX1.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1
comprende una VH que tiene al menos un 90, 95, 97, 98 o un
99% de identidad secuencial y una VL que tiene al menos un
20 90, 95, 97, 98 o un 99% de identidad secuencial con una VH
y VL seleccionadas a partir del grupo constituido por: (a)
una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID
N0:19 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la
SEQ ID N0:33; (b) una VH que tiene la secuencia de
25 aminoácidos de la SEQ ID N0:20 y una VL que tiene la secuencia
de aminoácidos de la SEQ ID N0:33; (c) una VH que tiene la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:21 y una VL que
tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:33; (d)
una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID
30 N0:22 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la
SEQ ID N0:33; (e) una VH que tiene la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID N0:23 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:33; (f) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:24 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:33; (g) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:25 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:33; (h) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:26 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:33; (i) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:27 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:37; (j) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:28 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:37; (k) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:48 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:65; (l) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:49 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:66; (m) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:50 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:67; (n) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:51 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:65; (o) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:54 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:68; (p) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:52 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:67; (q) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:54 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:69; (r) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:53 y una VL que

tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:58; y (s) una VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:41 y una VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:58. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporciona una proteína de unión a LOX1 aislada que comprende una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3. En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3 y una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En otros aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3 y una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5-12 o 13. En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3, 14-17 o 18 y una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 14-17 o 18 y una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, 5-12 o 13. En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 14-17 o 18 y una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, 5-12 o 13 y una CDR1-VH que

tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporciona una proteína de unión a LOX1 aislada que comprende una CDR3-VLH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32. En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 y una CDR2-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31. En otros aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32, una CDR2-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31 y una CDR1-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30. En otros aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32, 34 o 35 y una CDR2-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31. En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32, 34 o 35, una CDR2-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31 y una CDR1-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende una, dos o tres, CDR-VH tales como una CDR1-VH idéntica a la SEQ ID NO:1 o que tiene un total de una, dos o menos sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos respecto a ella, una CDR2-VH idéntica a la SEQ ID NO:2, 5-12 o 13 o que tiene un total de una, dos o menos sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos respecto a ellas, o una CDR3-VH idéntica a la SEQ ID NO:3, 14-17 o 18 o que tiene un total de una, dos, tres, cuatro o menos sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos respecto a ellas.

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende una, dos o tres, CDR-VL tales como una CDR1-VL idéntica a la SEQ ID NO:30 o que tiene un total de una, dos o menos sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos respecto a ella, una CDR2-VL idéntica a la SEQ ID NO:31 o que tiene un total de una, dos o menos sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos respecto a ella, o una CDR3-VH idéntica a la SEQ ID NO:32, 34 o 35 o que tiene un total de una, dos, tres, cuatro o menos sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos respecto a ellas.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende una secuencia de VH que tiene un total de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos respecto a una secuencia de VH de referencia de la SEQ ID NO:41. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras

transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporciona una proteína de unión a LOX1 aislada que comprende una VH de SEQ ID NO:41. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar las proteínas de unión a LOX1.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende una secuencia de VL que tiene un total de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos respecto a una secuencia de VL de referencia de la SEQ ID NO:58. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporciona una proteína de unión a LOX1 aislada que comprende una VL de SEQ ID NO:58. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una VH seleccionada entre una VH que contiene una CDR1-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

NO:38, una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:39, 42 o 43, y una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:40, 44-46 o 47; y una VL de la cadena ligera seleccionada entre una VL que contiene una
5 CDR1-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:55 o 59, una CDR2-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:56 o 60, y una CDR3-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:57, 61-63 o 64.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 aislada
10 tiene una VH que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 41, 48-53 o 54, y una VL que comprende una secuencia de la SEQ ID NO:58, 65-69 o 70. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos
15 y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende un conjunto de regiones determinantes de la
20 complementariedad (CDR): la CDR1 de la región variable de la cadena pesada (VH), CDR2-VH, CDR3-VH, la CDR1 de la región variable de la cadena ligera (VL), CDR2-VL y CDR3-VL, donde el conjunto de CDR es idéntico o tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones,
25 delecciones y/o inserciones de aminoácidos respecto a un conjunto de referencia de CDR en el que: (a) CDR1-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:38; (b) CDR2-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:39; (c) CDR3-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44;
30 (d) CDR1-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:55; (e) CDR2-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la

SEQ ID NO:60; y (f) CDR3-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:61. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células
5 hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende un conjunto de regiones determinantes de la
10 complementariedad (CDR): la CDR1 de la región variable de la cadena pesada (VH), CDR2-VH, CDR3-VH, la CDR1 de la región variable de la cadena ligera (VL), CDR2-VL y CDR3-VL, donde el conjunto de CDR es idéntico o tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones,
15 delecciones y/o inserciones de aminoácidos respecto a un conjunto de referencia de CDR en el que: (a) CDR1-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:38; (b) CDR2-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:39; (c) CDR3-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:40;
20 (d) CDR1-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:55; (e) CDR2-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:56; y (f) CDR3-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:57. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1,
25 vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1
30 comprende un conjunto de CDR: CDR1-VH, CDR2-VH, CDR3-VH, CDR1-VL, CDR2-VL y CDR3-VL donde: (a) CDR1-VH tiene la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:38; (b) CDR2-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:39; (c) CDR3-VH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:40; (d) CDR1-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:55; (e) CDR2-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:56; y (f) CDR3-VL tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:57. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporciona una proteína de unión a LOX1 aislada que comprende una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:40. En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:40 y una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:39. En otros aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:40 y una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 o 43. En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:40, 44-46 o 47 y una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:39. En aspectos adicionales,, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40, 44-46 o 47 y una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:39, 42 o 43. En aspectos adicionales,, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-

VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40, 44-46 o 47 y una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39, 42 o 43 y una CDR1-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:38. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporciona una proteína de unión a LOX1 aislada que comprende una CDR3-VLH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:57. En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:57 y una CDR2-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:56. En otros aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:57, una CDR2-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:56 y una CDR3-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:55. En otros aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende una CDR3-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:57, una CDR2-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:56 o 60 y una CDR1-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:55 o 59. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende una, dos o tres, CDR-VH tales como una CDR1-VH idéntica a la SEQ ID NO:38 o que tiene un total de una, dos o menos sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos respecto a ella, una CDR2-VH idéntica a la SEQ ID NO:39, 42 o 43 o que tiene un total de una, dos o menos sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos respecto a ella, o una CDR3-VH idéntica a la SEQ ID NO:40, 44-46 o 47 o que tiene un total de una, dos, tres, cuatro o menos sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos respecto a ellas. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende una, dos o tres CDR-VL tales como una CDR1-VL idéntica a la SEQ ID NO: 55 o 59 o que tiene un total de una, dos o menos sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos respecto a ellas, una CDR2-VL idéntica a la SEQ ID NO: 56 o 60 o que tiene un total de una, dos o menos sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos respecto a ellas, o una CDR3-VL idéntica a la SEQ ID NO: 57, 61-63 o 64 o que tiene un total de una, dos, tres, cuatro o menos sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos respecto a ellas . En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y

vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 comprende un conjunto de CDR: CDR1-VH, CDR2-VH, CDR3-VH, CDR1-VL, CDR3-VL y CDR3-VL tal como se describe en la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En algunos aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena ligera (VL) tal como se describe en la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de G F D P E D HX₁ HX₂ HX₃ HX₄ HX₅ HX₆ Q K F Q G (Gly Phe Asp Pro Glu Asp HX₁ HX₂ HX₃ HX₄ HX₅ HX₆ Gln Lys Phe Gln Gly), donde HX₁ es Gly, Trp, Tyr o Phe; HX₂ es Glu, Thr, Gln, Ser, Lys o Ala; HX₃ es Thr, Tyr, Ile o Asn; HX₄ es Ile, Ala, Arg o His; HX₅ es Tyr, Val, Thr, Leu o Gln, y HX₆ es Ala, Asp, Gly, Ser o His (SEQ ID NO:71).

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de HX₇ HX₈ G HX₉ HX₁₀ HX₁₁ HX₁₂ G V R G W D Y Y Y

G M D V (HX₇ HX₈ Gly HX₉ HX₁₀ HX₁₁ HX₁₂ Gly Val Arg Gly Trp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp) donde HX₇ es Pro, Ser o Val; HX₈ es Asn, Thr, Trp o Asp; HX₉ es Gln, Arg o Thr; HX₁₀ es Gln o His; HX₁₁ es Gly o Gln; HX₁₂ es Lys o Gly (SEQ ID NO:72).

5 En otros aspectos, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende una CDR3-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de Q S Y D S LX₁ LX₂ LX₃ LX₄ LX₅ LX₆ (Gln Ser Tyr Asp Ser LX₁ LX₂ LX₃ LX₄ LX₅ LX₆), donde LX₁ es Ser o Met; LX₂ es Leu, Tyr o His; LX₃ es Ser o Arg; LX₄ es Gly, Ala o ningún aminoácido; 10 LX₅ es Trp o Phe; y LX₆ es Val, Gly o Ala (SEQ ID NO:73).

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad (CDR): la CDR1 de la región variable de la cadena pesada (VH), CDR2-VH, CDR3-VH y la CDR1 de la región 15 variable de la cadena ligera (VL), CDR2-VL y CDR3-VL donde: (a) la CDR1-VH comprende la secuencia de aminoácidos: E L S M H (SEQ ID NO: 1); (b) la CDR2-VH comprende la secuencia de aminoácidos: G F D P E D HX₁ HX₂ HX₃ HX₄ HX₅ HX₆ Q K F Q G, donde HX₁ se selecciona a partir del grupo constituido por 20 G, W, Y y F, HX₂ se selecciona a partir del grupo constituido por E, T, Q, K, A y S, HX₃ se selecciona a partir del grupo constituido por T, Y, I y N, HX₄ se selecciona a partir del grupo constituido por I, A, R y H, HX₅ se selecciona a partir del grupo constituido por Y, V, T, L y Q, y HX₆ se selecciona a partir del grupo constituido por A, D, G, S y H (SEQ ID 25 NO: 71); (c) la CDR3-VH comprende la secuencia de aminoácidos: HX₇ HX₈ G HX₉ HX₁₀ HX₁₁ HX₁₂ G V R G W D Y Y Y G M D V, donde HX₇ se selecciona a partir del grupo constituido por P, S y V, HX₈ se selecciona a partir del grupo constituido por N, W, D y T, HX₉ se selecciona a partir del grupo 30 constituido por Q, R y T, HX₁₀ se selecciona a partir del

grupo constituido por Q y H, HX11 se selecciona a partir del grupo constituido por G y Q, y HX12 se selecciona a partir del grupo constituido por K y G (SEQ ID NO: 72); (d) la CDR1-VL comprende la secuencia de aminoácidos: T G S S S N I G A
5 G Y D V H (SEQ ID NO: 30); (e) la CDR2-VL comprende la secuencia de aminoácidos: G N S N R P S (SEQ ID NO: 31); y (f) la CDR3-VL comprende la secuencia de aminoácidos: Q S Y D S LX₁ LX₂ LX₃ LX₄ LX₅ LX₆, donde LX1 se selecciona a partir del grupo constituido por M y S, LX2 se selecciona a partir
10 del grupo constituido por L, Y y H, LX3 se selecciona a partir del grupo constituido por S y R, LX4 se selecciona a partir del grupo constituido por A y G o se omite (no hay aminoácidos), LX5 se selecciona a partir del grupo constituido por W y F y LX6 se selecciona a partir del grupo
15 constituido por V, G y A (SEQ ID NO: 73).

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende una CDR2-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de G HX₁ S HX₂ HX₃ HX₄ HX₅ HX₆ HX₇ HX₈ HX₉ HX₁₀ D S V K G (Gly HX₁ Ser HX₂ HX₃ HX₄ HX₅ HX₆ HX₇ HX₈ HX₉ HX₁₀ Asp Ser
20 Val Lys Gly), donde HX₁ es Ile o Val; HX₂ es Trp o Leu; HX₃ es Asn o Gln; HX₄ es Ser o Glu; HX₅ es Gly, Leu o Pro; HX₆ es Ser, Tyr o Asp; HX₇ es Ile, Thr o Arg; HX₈ es Gly o Tyr; HX₉ es Tyr o Met; y HX₁₀ es Ala o Asp (SEQ ID NO:74).

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende una CDR3-VH que tiene la secuencia de aminoácidos de E G HX₁₁ W N Y D A HX₁₂ D HX₁₃ (Glu Gly HX₁₁ Trp Asn Tyr Asp Ala HX₁₂ Asp HX₁₃), donde HX₁₁ es Asn o Ser; HX₁₂ es Phe o Leu; y HX₁₃ es Ile o Val (SEQ ID NO:75).

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende una CDR1-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de T G T S LX₁ D V G G Y N Y V S (Thr Gly Thr
30

Ser LX₁ Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser), donde LX₁ es Ser o Asn (SEQ ID NO:76).

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende una CDR2-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de D V S LX₂ R P S (Asp Val Ser X₄ Arg Pro Ser),
5 donde LX₂ es Asn o Lys (SEQ ID NO:77).

En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 aislada comprende una CDR3-VL que tiene la secuencia de aminoácidos de LX₃ LX₄ LX₅ LX₆ LX₇ LX₈ S T N W V (LX₃ LX₄ LX₅
10 LX₆ LX₇ LX₈ Ser Thr Asn Trp Val), donde LX₃ es Ser, Leu, Met, or Ala; LX₄ es Ser, Gly o Gln; LX₅ es Tyr, Arg, Ser o Gly; LX₆ es Thr o Met; LX₇ es Ser, Trp, Gly o Val; y LX₈ es Ser o Arg (SEQ ID NO:78).

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 aislada
15 comprende un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad (CDR): la CDR1 de la región variable de la cadena pesada (VH), CDR2-VH, CDR3-VH y la CDR1 de la región variable de la cadena ligera (VL), CDR2-VL y CDR3-VL donde:
(a) la CDR1-VH comprende la secuencia de aminoácidos: D Y A
20 M H (SEQ ID NO: 38); (b) la CDR2-VH comprende la secuencia de aminoácidos: G HX₁ S HX₂ HX₃ HX₄ HX₅ HX₆ HX₇ HX₈ HX₉ HX₁₀ D S V K G, donde HX₁ se selecciona a partir del grupo constituido por I y V, HX₂ se selecciona a partir del grupo constituido por W y L, HX₃ se selecciona a partir del grupo
25 constituido por N y Q, HX₄ se selecciona a partir del grupo constituido por S y E, HX₅ se selecciona a partir del grupo constituido por G, L y P, HX₆ se selecciona a partir del grupo constituido por S, Y y D, HX₇ se selecciona a partir del grupo constituido por I, T y R, HX₈ se selecciona a
30 partir del grupo constituido por G y Y, HX₉ se selecciona a partir del grupo constituido por M y Y, y

HX10 se selecciona parte del grupo constituido por A y D (SEQ ID NO:74); (c) la CDR3-VH comprende la secuencia de aminoácidos: E G HX₁₁ W N Y D A HX₁₂ D HX₁₃, donde HX11 se selecciona a partir del grupo constituido por N y S, HX12 se selecciona a partir del grupo constituido por F y L, y HX13 se selecciona a partir del grupo constituido por I y V (SEQ ID NO:75); (d) la CDR1-VL comprende la secuencia de aminoácidos: T G T S LX₁ D V G G Y N Y V S, donde LX1 se selecciona a partir del grupo constituido por N y S (SEQ ID NO:76); (e) la CDR2-VL comprende la secuencia de aminoácidos: D V S LX₂ R P S, donde LX2 se selecciona a partir del grupo constituido por N y K (SEQ ID NO:77); y (f) la CDR3-VL comprende la secuencia de aminoácidos: LX₃ LX₄ LX₅ LX₆ LX₇ LX₈ S T N W V, donde LX3 se selecciona a partir del grupo constituido por L, M, A y S, LX4 se selecciona a partir del grupo constituido por S, Q y G, LX5 se selecciona a partir del grupo constituido por Y, S, G y R, LX6 se selecciona a partir del grupo constituido por T y M, LX7 se selecciona a partir del grupo constituido por S, W, G y V, y LX8 se selecciona a partir del grupo constituido por S y R (SEQ ID NO:78).

En algunos aspectos, el conjunto de CDR de una proteína de unión a LOX1 divulgada en la presente se proporciona dentro de las regiones de armazón del anticuerpo u otros esqueletos proteicos conocidos en la técnica. Las regiones de armazón del anticuerpo a modo de ejemplo incluyen: las regiones de armazón de la línea germinal, tales como VH1-24 (DP-5), JH6, VH3-09 (DP-31) y JH3 para la región de armazón del anticuerpo de la cadena pesada y V λ 1e (DPL-8), V λ 2a2 (DPL-11) y JL3 para la región de armazón del anticuerpo de la cadena ligera y/o cualesquiera regiones de armazón

adecuadas con las que esté familiarizado el experto en la técnica.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 contiene una o más regiones de armazón procedentes de una región variable de la cadena pesada (VH) y/o una región variable de la cadena ligera (VL) que estén en un armazón de una línea germinal. Las regiones de armazón del dominio de la cadena pesada se pueden seleccionar entre las regiones de armazón VH1-24 (DP-5), JH6, VH3-09 (DP-31) y JH3, y/o cualesquiera regiones de armazón o esqueletos proteicos adecuados conocidos en la técnica. Las regiones de armazón del dominio de la cadena ligera se pueden seleccionar entre las regiones de armazón V λ 1e (DPL-8), V λ 2a2 (DPL-11) y JL3, y/o cualesquiera regiones de armazón o esqueletos proteicos adecuados conocidos en la técnica. Se pueden escoger una o más CDR de las proteínas de unión a LOX1 divulgadas en la presente (por ejemplo, una proteína de unión a LOX1 descrita en la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5) e incorporada a un armazón y/o esqueleto proteico adecuado.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporciona una proteína de unión a LOX1 que se une al mismo epítipo de LOX1 que un anticuerpo que comprende una VH y VL de la SEQ ID N0:4 y la SEQ ID N0:33, respectivamente.

En otros aspectos, en la divulgación se proporcionan proteínas de unión a LOX1 (por ejemplo, anticuerpos tales como anticuerpos contra LOX1 completos, fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos y variantes y derivados de estos) que compiten o compiten de manera cruzada por la unión a LOX1 con un anticuerpo que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID N0:4 y una secuencia de VL de la SEQ ID N0:33. En un aspecto particular, la proteína de unión a LOX1 es capaz de

inhibir de manera competitiva la unión a LOX1 de un anticuerpo que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID NO:4 y una secuencia de VL de la SEQ ID NO:33.

También se proporciona una proteína de unión a LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo y variantes y derivados de estos) que se puede unir a LOX1 con una afinidad mayor que una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) que comprende la VH de la SEQ ID NO:29 y la VL de la SEQ ID NO:33. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporciona una proteína de unión a LOX1 que se une al mismo epítipo de LOX1 que un anticuerpo que comprende una VH y VL de la SEQ ID NO:41 y la SEQ ID NO:58, respectivamente.

En otros aspectos, en la divulgación se proporcionan proteínas de unión a LOX1 (por ejemplo, anticuerpos tales como anticuerpos contra LOX1 completos y fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos, y variantes y derivados de estos) que compiten o compiten de manera cruzada por la unión a LOX1 con un anticuerpo que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID NO:41 y una secuencia de VL de la SEQ ID NO:58. En un aspecto particular, la proteína de unión a LOX1 es capaz de inhibir de manera competitiva la unión a LOX1 de un anticuerpo que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID NO:41 y una secuencia de VL de la SEQ ID NO:58.

También se proporciona una proteína de unión a LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) que se puede unir a LOX1 con una afinidad mayor que un anticuerpo completo que comprende la VH de la SEQ ID NO:54 y la VL de la SEQ ID NO:70. En la divulgación también se proporcionan ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a LOX1, vectores que contienen esos ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas con esos ácidos nucleicos y vectores, y métodos para generar y utilizar la proteína de unión a LOX1.

En algunos aspectos, el anticuerpo contra LOX1 que se proporciona en la presente es un anticuerpo murino, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico o cualquier combinación de estos. En algunos aspectos, el anticuerpo contra LOX1 es un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento dsFv, un fragmento scFv o un fragmento sc(Fv)₂.

En la divulgación, se proporciona una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) que se puede unir a las moléculas de LOX1 de diferentes especies. En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 se une a LOX1 humano (hLOX1) y LOX1 de cinomolgo (cinoLOX1). En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 se une a LOX1 humano (hLOX1) y LOX1 de conejo. En más aspectos, la proteína de unión a LOX1 se une a hLOX1, cinoLOX1 y LOX1 de

conejo. En ciertos aspectos que se proporcionan en la presente, una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1) se une de manera específica a LOX1 (por ejemplo, hLOX1, cinoLOX1 y/o LOX1 de conejo) y no se
5 une a uno o más de: CLEC-7A, CLEC-1A, CLEC-4L, CLEC-1B, SR-A1 y/o SR-B3. Remítase, por ejemplo, a las Figuras 3, 6 y 7.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 aislado o de este) comprende además una cadena pesada mutante TM de la IgG1
10 humana, donde la región variable de la cadena pesada (VH) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o un 100% de identidad secuencial con la secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO:4, 19-28 o 29.

15 En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 aislado o de este) comprende además una cadena pesada mutante TM de la IgG1 humana, donde la región variable de la cadena pesada (VH) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un
20 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o un 100% de identidad secuencial con la secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO:41, 48-53 o 54.

En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de
25 unión a LOX1 de un anticuerpo, y una variante y derivado de estos) incluye además de una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena ligera (VL), y de manera opcional una región constante de la cadena pesada o un fragmento de esta, una región constante de la cadena
30 ligera o un fragmento de esta. En ciertos aspectos, la región constante de la cadena ligera es una región constante de la

cadena ligera κ λ , por ejemplo, una región constante κ humana o una región constante λ humana. En un aspecto específico, la región constante de cadena ligera es una región constante κ humana.

5 En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y una variante y derivado de estos) tiene una región variable de la cadena ligera (VL) que contiene una región constante κ humana, por
10 ejemplo, la VL comprende una secuencia de aminoácidos de VL que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o un 100% de identidad secuencial con la secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO:33, 36 o 37. En ciertos aspectos, en la divulgación se proporciona una proteína de unión a
15 LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de éste) que comprende además una cadena pesada mutante TM de la IgG1 humana y una cadena ligera κ humana, donde la región variable de la cadena pesada (VH) y la región variable de la cadena ligera (VL) comprenden: la SEQ ID NO:4 y la SEQ
20 ID NO:33; la SEQ ID NO:29 y la SEQ ID NO:33; la SEQ ID NO:41 y la SEQ ID NO:58; o la SEQ ID NO:54 y la SEQ ID NO:70, respectivamente.

 En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo, un
25 fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y una variante y derivado de estos) tiene una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende además una región constante κ humana, por ejemplo, la cadena ligera puede comprender una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera que tiene al
30 menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o un 100% de identidad secuencial con la secuencia de aminoácidos de referencia de

la SEQ ID NO:58, 65-69 o 70. En ciertos aspectos, en la divulgación se proporciona una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de éste) que comprende además una cadena pesada mutante TM de la IgG1 humana y una cadena ligera κ humana, donde la región variable de la cadena pesada (VH) y la región variable de la cadena ligera (VL) comprenden: la SEQ ID NO:41 y la SEQ ID NO:58, la SEQ ID NO:48 y la SEQ ID NO:65, la SEQ ID NO:49 y la SEQ ID NO:66, la SEQ ID NO:50 y la SEQ ID NO:67 o la SEQ ID NO:53 y la SEQ ID NO:58, respectivamente.

En algunos aspectos, en la divulgación se proporciona una proteína de unión a LOX1 aislada tal como un anticuerpo contra LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y una variante y derivado de estos), donde la proteína de unión a LOX1 tiene al menos una propiedad seleccionada a partir del grupo constituido por: (a) reduce o inhibe la unión de oxLDL, proteína C-reactiva (CRP) y/o productos finales de glucación avanzada (AGE) a LOX1, según se determine mediante cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en la presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo 10, ensayos 1, 2 y/o 3 o el Ejemplo 11); (b) disminuye o inhibe la señalización de RhoA/Rac1, monóxido de nitrógeno (NO), p38MAPK, proteína-cinasas B y C, ERK1/2 y/o NF κ B en una célula endotelial que expresa LOX1 en la superficie celular según se determina mediante cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en la presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo 11); (c) disminuye o inhibe la actividad de la caspasa-8, caspasa-9 y/o BAX en una célula endotelial que expresa LOX1 en la superficie celular según se determina mediante cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo

divulgado en la presente; (d) se une a LOX1 que tiene el polimorfismo mononucleotídico K167N según se determina mediante cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en la presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo 5 10, ensayos 1, 2 y/o 3 o el Ejemplo 11); (e) reduce o inhibe la internalización de oxLDL según se determina mediante cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en la presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo 10, ensayo 4 o Ejemplo 11); (f) reduce o inhibe la señalización de LOX1 10 inducida por oxLDL según se determina mediante cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en la presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo 10, ensayo 5 o el Ejemplo 11); (g) se une a LOX1 con una constante de disociación (KD) de aproximadamente 150 pM a aproximadamente 15 600 pM (por ejemplo, de aproximadamente 400 pM) según se determina mediante BIACORE o KinExA; (h) se une a LOX1 con una constante de velocidad K_{on} de aproximadamente $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a aproximadamente $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (por ejemplo, de aproximadamente $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) según se determina mediante 20 BIACORE; e (i) se une a LOX1 con una constante de velocidad K_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a aproximadamente $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (por ejemplo, de aproximadamente $2.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) según se determina mediante BIACORE.

En ciertos aspectos, el bloqueo de la actividad 25 biológica de LOX1 por parte de una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) descrito en la presente, reduce la aterosclerosis y/o disminuye una o más afecciones asociadas con la aterosclerosis. En aspectos particulares, el antagonista de 30 LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) inhibe o disminuye el desarrollo mediado por LOX1

de las lesiones ateroscleróticas, la arteriopatía coronaria, accidente cerebrovascular, isquemia, infarto, enfermedad vascular periférica, lesión por reperfusión u otros síntomas clínicos asociados con el desarrollo de la aterosclerosis.

5 En ciertos aspectos, una proteína de unión a LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y una variante y derivado de estos) se puede unir de manera específica a LOX1, por ejemplo, LOX1 humano
10 (hLOX1) y/o LOX1 de cinomolgo (cinoLOX1) y fragmentos antigénicos de estos con una constante de disociación o K_D de menos de 10^{-6} M, o de menos de 10^{-7} M, o de menos de 10^{-8} M, o de menos de 10^{-9} M, o de menos de 10^{-10} M, o de menos de 10^{-11} M, de menos de 10^{-12} M, de menos de 10^{-13} M, de menos de
15 10^{-14} M o de menos de 10^{-15} M según se mide, por ejemplo, por KINEXA® o BIACORE®. En un aspecto, el anticuerpo contra LOX1 se puede unir a hLOX1 y cinoLOX1 con una K_D de menos de aproximadamente 1×10^{-8} M a aproximadamente 1×10^{-10} M según se mide por BIACORE®.

20 En otro aspecto, una proteína de unión a LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y una variante y derivado de estos) se puede unir a LOX1 con una K_{off} de menos de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos de $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. En otros
25 aspectos, la proteína de unión a LOX1 se une a LOX1 con una K_{off} de menos de 10^{-3} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-4} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-5} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-6} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, menos de menos de $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-8} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, menos de
30 10^{-9} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ o menos de 10^{-10} s^{-1} según se mide, por ejemplo, por KINEXA® o BIACORE®. En un aspecto, el

anticuerpo contra LOX1 se puede unir a hLOX1 y cinoLOX1 con una K_{off} de 1 a $10 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ según se mide por BIACORE®.

En otro aspecto, una proteína de unión a LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y una variante y derivado de estos) se puede unir a LOX1, por ejemplo, LOX1 humano (hLOX1) y/o LOX1 de cinomolgo, con una constante de velocidad de asociación o velocidad k_{on} de al menos $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o al menos $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o al menos $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ según se mide, por ejemplo, por KINEXA® o BIACORE®. En un aspecto, el anticuerpo contra LOX1 se puede unir a hLOX1 y cinoLOX1 con una velocidad k_{on} de aproximadamente $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a aproximadamente $20 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ según se mide por BIACORE®.

Tal como se ha mencionado anteriormente, una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y una variante y derivado de este) que contiene una secuencia de aminoácidos de la VH y/o VL que se une a LOX1 puede tener al menos un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99% de identidad secuencial con una secuencia expuesta en la presente (remítase, por ejemplo, la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5). En algunos aspectos, la secuencia o las secuencias de aminoácidos de la VH y/o VL que se unen a LOX1 comprenden 15 o menos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15) adiciones, sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras) o deleciones de aminoácidos respecto a una secuencia expuesta en la presente. En algunos aspectos, la secuencia o las secuencias de aminoácidos de la

VH y/o VL que se unen a LOX1 comprenden 8 o menos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) adiciones, sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras) o deleciones de aminoácidos respecto a una secuencia expuesta en la presente.

5 En aspectos adicionales, la secuencia de aminoácidos de la VH y/o VL que se une a LOX1 comprende 5 o menos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) adiciones, sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras) o deleciones de aminoácidos respecto a una secuencia expuesta en la presente. Una
10 proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de éste) que contiene las regiones de VH y VL que tienen una cierta similitud porcentual con una región de VH o una región de VL, o que tienen una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones (por ejemplo,
15 sustituciones conservadoras) se puede obtener mediante mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis mediada por PCR o dirigida al sitio) de moléculas de ácido nucleico que codifica las regiones de VH y/o VL descritas en la presente, seguida por el estudio de la unión del anticuerpo alterado
20 codificado a LOX1 y, de manera opcional, el estudio de la función conservada utilizando los ensayos funcionales descritos en la presente o un ensayo conocido en la técnica que se pueda modificar de manera rutinaria para estudiar la función conservada.

25 La afinidad o avidez de una proteína de unión a LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y una variante y derivado de estos) por LOX1 se puede determinar de manera experimental
30 utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, citometría de flujo, ensayo de inmunoabsorción

enzimática (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA) o análisis cinéticos (por ejemplo, análisis por KINEXA® or BIACORE®). Se pueden emplear fácilmente formatos de ensayos de unión directa así como también de ensayos de unión competitiva.

5 (Remítase a, por ejemplo, Berzofsky *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: Nueva York, N.Y. (1984); Kuby, Immunology, W. H. Freeman and Company: Nueva York, N.Y. (1992); y los métodos descritos en la presente). La afinidad

10 medida de una interacción concreta anticuerpo-antígeno puede variar si se mide en condiciones diferentes (por ejemplo, concentración salina, pH o temperatura). Por tanto, se realizan mediciones de la afinidad y otros parámetros de unión a LOX1 (por ejemplo, K_D o K_d , K_{on} , K_{off}) con disoluciones

15 normalizadas de proteínas de unión a LOX1 y LOX1, y un tampón normalizado, tal como se conoce en la técnica, tal como el tampón descrito en la presente.

En la divulgación se proporciona además una proteína de unión a LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 (por ejemplo,

20 un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y una variante y derivado de estos), tal como se describe en la presente (remítase, por ejemplo, a la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5), donde el anticuerpo se conjuga a un agente heterólogo. En ciertos aspectos, el

25 agente es un agente antimicrobiano, un agente terapéutico, un profármaco, un péptido, una proteína, una enzima, un líquido, un modificador de la respuesta biológica, un agente farmacéutico, una linfoquina, un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo heterólogo, una marca detectable o un

30 polietilenglicol (PEG). Las proteínas de unión a LOX1

heteroconjugadas se analizan en más detalle en otra sección de la presente.

En ciertos aspectos, la proteína de unión a LOX1 no es un anticuerpo contra LOX1. En la técnica se conocen varios métodos para identificar y producir polipéptidos que no son anticuerpos que se unen con una afinidad elevada a una proteína diana. Remítase, por ejemplo, a Skerra, *Curr. Opin. Biotech.* 18:295-304 (2007), Hosse *et al.*, *Protein Science* 15:14-27 (2006), Gill *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 17:653-658 (2006), Nygren, *FEBS J.* 275:2668-76 (2008), y Skerra, *FEBS J.* 275:2677-83 (2008), cada uno de los cuales es incorporado a la presente a modo de referencia en su totalidad. En ciertos aspectos, se puede utilizar la tecnología de presentación en fagos para identificar/producir una proteína de unión a LOX1. En ciertos aspectos, el polipéptido comprende un esqueleto proteico de un tipo seleccionado a partir del grupo constituido por anquirina, proteína A, una lipocalina, un dominio de fibronectina, un dominio de repetición consenso de anquirina y tiorredoxina.

Proteínas que se une al mismo epítipo que una proteína de unión a LOX1

En ciertos aspectos, en la divulgación se proporcionan proteínas de unión a LOX1 (por ejemplo, anticuerpos contra LOX1 tales como anticuerpos contra LOX1 completos, fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos y variantes y derivados de estos) que se unen al mismo epítipo que una o más proteínas de unión a LOX1 divulgadas en la presente (remítase, por ejemplo, a la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5). El término "epítipo", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un determinante proteico diana capaz de unirse a

un anticuerpo de la divulgación. Normalmente, los epítomos están constituidos por agrupaciones superficiales activas desde un punto de vista químico de moléculas tales como cadenas laterales de azúcares o aminoácidos y normalmente

5 tienen unas características estructurales tridimensionales específicas, así como también unas características de carga específicas. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se diferencian en que la unión a los primeros, pero no a los segundos, se pierde en presencia de

10 disolventes desnaturalizantes. Tales anticuerpos se pueden identificar en función de su capacidad para competir de manera cruzada (por ejemplo, para inhibir de manera competitiva la unión, de manera significativa desde un punto de vista estadístico) con anticuerpos que comprenden una

15 secuencia de VH de la SEQ ID NO:4 y una secuencia de VL de la SEQ ID NO:33 y/o anticuerpos que comprenden una secuencia de VH de la SEQ ID NO:41 y una secuencia de VL de la SEQ ID NO:58 en ensayos de actividad o de unión al antígeno estándar.

20 La divulgación también proporciona proteínas de unión a LOX1 tales como anticuerpos contra LOX1 (por ejemplo, anticuerpos contra LOX1 completos, fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos, y variantes y derivados de estos) que se unen al mismo epítomo que una proteína de unión a LOX1

25 aislada divulgada en la presente (remítase, por ejemplo, a la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5).

La capacidad de una proteína de unión a LOX1 de prueba para inhibir la unión de, por ejemplo, un anticuerpo que comprende la secuencia de VH de la SEQ ID NO:4 y una secuencia

30 de VL de la SEQ ID NO:33 y/o anticuerpos que comprenden una secuencia de VH de la SEQ ID NO:41 y una secuencia de VL de

la SEQ ID N0:58, demuestra que la proteína de unión a LOX1 de prueba puede competir con ese anticuerpo para unirse a LOX1; de la misma manera que, de acuerdo con la teoría no limitante, una proteína de unión a LOX1 puede unirse al mismo epítipo o a uno relacionado (por ejemplo, similar desde un punto de vista estructural o próximo desde un punto de vista espacial) de LOX1, al igual que las proteínas de unión a LOX1 (por ejemplo, anticuerpos contra LOX1 tales como anticuerpos contra LOX1 completos, fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos, y variantes y derivados de estos) con las cuales compite. En un aspecto, la proteína de unión a LOX1 se une al mismo epítipo de LOX1 que un anticuerpo que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID N0:4 y una secuencia de VL de la SEQ ID N0:33. En otro aspecto, la proteína de unión a LOX1 se une al mismo epítipo de LOX1 que un anticuerpo que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID N0:41 y una secuencia de VL de la SEQ ID N0:58.

En un aspecto, en la divulgación se proporcionan proteínas de unión a LOX1 (por ejemplo, anticuerpos tales como anticuerpos contra LOX1 completos, fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos, y variantes y derivados de estos) que compiten por la unión a LOX1 con un anticuerpo que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID N0:4 y una secuencia de VL de la SEQ ID N0:33. En otro aspecto, en la divulgación se proporcionan proteínas de unión a LOX1 (por ejemplo, anticuerpos tales como anticuerpos contra LOX1 completos, fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos, y variantes y derivados de estos) que compiten por la unión a LOX1 con un anticuerpo que comprende una secuencia de VH de la SEQ ID N0:41 y una secuencia de VL de la SEQ ID N0:58.

IV. Actividad de las proteínas de unión a LOX1

En algunos aspectos, una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) tiene al menos una propiedad seleccionada a partir del grupo constituido por: (a) reduce o inhibe la unión de oxLDL, proteína C-reactiva (CRP) y/o productos finales de glucación avanzada (AGE) a LOX1, según se determina mediante cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en la presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo 10, ensayos 1, 2 y/o 3 o el Ejemplo 11); (b) disminuye o inhibe la señalización de RhoA/Rac1, monóxido de nitrógeno (NO), p38MAPK, proteínas-quinasas B y C, ERK1/2 y/o NF κ B en una célula endotelial que expresa LOX1 en la superficie celular según se determina mediante cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en la presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo 11); (c) disminuye o inhibe la actividad de la caspasa-8, caspasa-9 y/o BAX en una célula endotelial que expresa LOX1 en la superficie celular según se determina mediante cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en la presente; (d) se une a LOX1 que tiene el polimorfismo mononucleotídico K167N según se determina mediante cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en la presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo 10, ensayos 1, 2 y/o 3 o el Ejemplo 11); (e) reduce o inhibe la internalización de oxLDL según se determina mediante cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en la presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo 10, ensayo 4 o Ejemplo 11); (f) reduce o inhibe la señalización de LOX1 inducida por oxLDL según se determina mediante cualquier ensayo adecuado que incluye un ensayo divulgado en la

presente (remítase a, por ejemplo, el Ejemplo 10, ensayo 5 o el Ejemplo 11); (g) se une a LOX1 con una constante de disociación (KD) de aproximadamente 150 pM a aproximadamente 600 pM (por ejemplo, de aproximadamente 400 pM) según se determina mediante BIACORE o KinExA; (h) se une a LOX1 con una constante de velocidad K_{on} de aproximadamente $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a aproximadamente $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (por ejemplo, de aproximadamente $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) según se determina mediante BIACORE; e (i) se une a LOX1 con una constante de velocidad K_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a aproximadamente $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (por ejemplo, de aproximadamente $2.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) según se determina mediante BIACORE.

En algunos aspectos, una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) puede suprimir, inhibir o reducir la transducción de señales mediada por LOX1 en células que expresan LOX1. En algunos aspectos, una proteína de unión a LOX1 puede suprimir, inhibir o reducir la activación mediada por LOX1 de la ruta de transducción de señales por RhoA/Rac1, monóxido de nitrógeno, p38MAPK, proteína-cinasas B y C, ERK1/2 y/o NF κ B, según se mide mediante un ensayo con células, por ejemplo, tal como se describe en la presente, con una CI_{50} inferior a aproximadamente 500 pM, inferior a aproximadamente 450 pM, inferior a aproximadamente 450 pM, inferior a aproximadamente 350 pM, inferior a aproximadamente 300 pM, inferior a aproximadamente 250 pM, inferior a aproximadamente 150 pM, inferior a aproximadamente 100 pM, inferior a aproximadamente 75 pM, inferior a aproximadamente 100 nM, inferior a aproximadamente 75 nM, inferior a

aproximadamente 50 nM, inferior a aproximadamente 30 nM, inferior a aproximadamente 20 pM, inferior a aproximadamente 10 nM o inferior a aproximadamente 5 nM.

En ciertos aspectos, una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) puede suprimir, inhibir o reducir la activación mediada por LOX1 de cinomolgo de la ruta de señalización de RhoA/Rac1, monóxido de nitrógeno, p38MAPK, proteína-cinasas B y C, ERK1/2 y/o NF κ B en células endoteliales, células de músculo liso y/o macrófagos de cinomolgo que expresan LOX1 con una CI₅₀ de aproximadamente 700 pM, aproximadamente 550 pM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 300 pM, aproximadamente 250 pM, aproximadamente 220 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 1 pM, aproximadamente 0.1, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 30 nM, aproximadamente 50 nM o aproximadamente 100 nM. En ciertos aspectos, una proteína de unión a LOX1 puede suprimir, inhibir o reducir la activación mediada por LOX1 de cinomolgo en las células endoteliales, células de músculo liso y/o macrófagos de cinomolgo que expresan LOX1 con una CI₅₀ de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 500 pM.

En aspectos adicionales, una proteína de unión a LOX1 antagonista (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) puede suprimir, inhibir o reducir la activación mediada por LOX1 humano de la ruta de transducción de señales de RhoA/Rac1, monóxido de nitrógeno, p38MAPK, proteína-cinasas B y C,

ERK1/2 y/o NF κ B medida utilizando un ensayo con células, por ejemplo, tal como se describe en la presente, en células endoteliales, células de músculo liso y/o macrófagos que expresan LOX1 con una CI₅₀ de aproximadamente 300 pM, aproximadamente 250 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 55 pM, aproximadamente 44 pM, aproximadamente 1 pM, aproximadamente 0.1 pM, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 50 nm, aproximadamente 44 nM, aproximadamente 10 nM o aproximadamente 3 nM.

En algunos aspectos, una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) inhibe o reduce la unión de LOX1 a oxLDL. En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 inhibe o reduce la unión de LOX1 a múltiples ligandos de LOX1. En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 inhibe o reduce la unión de LOX1 a oxLDL y AGE. En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 inhibe o reduce la unión de LOX1 a oxLDL y CRP. En algunos aspectos, la proteína de unión a LOX1 inhibe o reduce la unión de LOX1 a oxLDL, AGE y CRP. En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 inhibe o reduce la unión de LOX1 a oxLDL, CEP, fosfatidilserina, AGE avanzados, lipoproteínas densas pequeñas (sdLDL), HDL oxidadas, N4-oxononaoíl-lisina (ONL), proteínas de choque térmico (hsp, por ejemplo, HSP60), *Chlamydia pneumoniae*, trombocitos, leucocitos y/o células apoptóticas. Los métodos para medir la inhibición o reducción de la unión de LOX-1 a uno o más ligandos incluyen los descritos en la presente en los Ejemplos y cualquier método adecuado diferente conocido en la técnica.

V. Preparación de anticuerpos contra LOX1

En ciertos aspectos, las proteínas de unión a LOX1 son anticuerpos contra LOX1 tales como anticuerpos contra LOX1 completos, fragmentos de unión a LOX1 de un anticuerpo, y
5 variantes y derivados de estos.

Los anticuerpos monoclonales contra LOX1 se pueden preparar utilizando métodos con hibridomas tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature* 256:495 (1975). Utilizando el método con hibridomas, se inmuniza un ratón,
10 hámster, u otro animal hospedador apropiado, tal como se describe anteriormente para provocar la producción por parte de los linfocitos de anticuerpos que se unirán de manera específica a un antígeno de inmunización. También pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. Después de la inmunización,
15 se aíslan los linfocitos y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada utilizando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de tipo hibridoma que se pueden seleccionar a continuación separándolas de los linfocitos no fusionados y de las células de mieloma. Los
20 hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos de manera específica contra LOX1, tal como hLOX1, según se determina mediante inmunoprecipitación, inmunotransferencia o mediante un ensayo de unión *in vitro* (por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA); ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA)) se pueden propagar a continuación en un cultivo *in vitro* utilizando métodos habituales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986) o *in vivo* como tumores con ascitis en un animal. A continuación, los anticuerpos monoclonales se pueden
30 purificar a partir del medio de cultivo o líquido ascítico

tal como se ha descrito anteriormente para los anticuerpos policlonales.

Como alternativa, los anticuerpos monoclonales contra LOX1 también se pueden generar utilizando métodos de ADN recombinante como se describe en la patente de EE. UU. N.º 4 816 567. Los polinucleótidos que codifican para un anticuerpo monoclonal se aíslan de linfocitos B maduros o célula de tipo hibridoma, por ejemplo, mediante RT-PCR utilizando cebadores de oligonucleótidos que amplifican de manera específica los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y se determina su secuencia utilizando procedimientos habituales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesada y ligera se clonan a continuación en vectores de expresión adecuados, que cuando se utilizan para transfectar células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), células Per.C6 o células de mieloma (por ejemplo, células NS0) que no producen por lo demás la proteína inmunoglobulina, hacen que las células hospedadoras generen anticuerpos monoclonales. Además, se pueden aislar anticuerpos monoclonales anti-LOX1 recombinantes a partir de colecciones de presentación en fagos que expresan CDR de la especie deseada tal como se ha descrito (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991); y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)).

El ácido o los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo contra LOX1, tal como un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos, se pueden modificar adicionalmente de varias maneras diferentes utilizando la

tecnología del ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En algunos aspectos, los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón puede sustituirse (1) por esas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o (2) por un polipéptido que no es la inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En algunos aspectos, las regiones constantes se truncan o se retiran para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Puede usarse mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc. de un anticuerpo monoclonal.

En ciertos aspectos, la proteína de unión contra LOX1 se une a LOX1 humano tal como un anticuerpo contra hLOX1 completo y un fragmento de unión a hLOX1 de un anticuerpo humano, y variantes y derivados de estos. Se pueden preparar directamente anticuerpos humanos utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica. Pueden generarse linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados a partir de un individuo inmunizado que produce un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (remítase, por ejemplo, Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boemer *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1):86-95(1991); y la patente de EE. UU. N.º 5 750 373).

Asimismo, el anticuerpo humano contra LOX1 (por ejemplo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo humano) se puede seleccionar a partir de una colección de fagos, donde esa colección de fagos expresa anticuerpos humanos como se describe, por ejemplo, en Vaughan *et al.*,

Nat. Biotech., 14:309-314 (1996), Sheets *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 95:6157-6162 (1998), Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991), y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991)). Las técnicas para la generación y la utilización de colecciones de fagos con anticuerpos también se describen en las patentes de EE. UU. N.^{os} 5 969 108, 6 172 197, 5 885 793, 6 521 404; 6 544 731; 6 555 313; 6 582 915; 6 593 081; 6 300 064; 6 653 068; 6 706 484; y 7 264 963; y Rothe *et al.*, *J. Mol. Biol.* 376(4): 1182-200 (2008) (cada uno de los cuales se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad).

En la técnica existe constancia de estrategias de maduración de la afinidad y estrategias de reordenamiento de cadenas (Marks *et al.*, *BioTechnology* 10:779-783 (1992), que se incorpora a modo de referencia en su totalidad) y se pueden emplear para generar anticuerpos humanos contra LOX1 con una afinidad elevada.

En algunos aspectos, un anticuerpo contra LOX1, tal como un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) puede ser un anticuerpo humanizado. También se pueden utilizar métodos para manipular, humanizar o modificar la superficie de anticuerpos humanos o no humanos y existe constancia de estos en la técnica. Un anticuerpo humanizado, con la superficie modificada o manipulado de manera similar puede tener uno o más residuos aminoacídicos de una fuente que es no humana, por ejemplo, sin carácter limitante, ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos residuos aminoacídicos no humanos son reemplazados por residuos que se denominan a menudo residuos "importados", que se toman normalmente de un dominio "importado" variable,

constante o diferente de una secuencia humana conocida. Tales secuencias importadas se pueden utilizar para reducir la inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar la unión, afinidad, velocidad de asociación, velocidad de disociación, 5 aidez, especificidad, semivida, o cualquier otra característica adecuada, tal como se conoce en la técnica. En general, los residuos de CDR participan directamente y de la manera más importante influenciando la unión a LOX1. Por consiguiente, parte o todas las secuencias de CDR no humanas 10 o humanas se mantienen mientras que las secuencias no humanas de las regiones variable y constante pueden ser reemplazadas por aminoácidos humanos o de otro tipo.

De manera opcional, los anticuerpos contra LOX1 también pueden estar humanizados, modificados en su superficie, 15 manipulados o ser anticuerpos humanos modificados que conservan una afinidad elevada por el antígeno de LOX1 y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, se pueden preparar de manera opcional anticuerpos contra LOX1 humanizados (o humanos) o manipulados, tales 20 como un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos tales como anticuerpos con la superficie modificada, mediante un proceso de análisis de las secuencias progenitoras y varios productos manipulados y humanizados 25 conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias progenitoras, manipuladas y humanizadas. Los expertos en la técnica pueden consultar los modelos de la inmunoglobulina tridimensionales y están familiarizados con ellos. Se puede disponer de programas informáticos que 30 ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de

inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite analizar el papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno, tal como LOX1. De esta manera, se pueden seleccionar y combinar residuos de la región de armazón (FW) a partir de las secuencias consenso e importada de modo que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el antígeno o los antígenos diana.

La humanización, modificación de la superficie o manipulación de los anticuerpos contra LOX1 de la divulgación se puede llevar a cabo utilizando cualquier método incluidos, sin carácter limitante, los descritos en Jones *et al.*, *Nature* 321:522 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534 (1988)), Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987), Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151:2623 (1993), patentes de EE. UU. N.ºs 5 639 641, 5 723 323; 5 976 862; 5 824 514; 5 817 483; 5 814 476; 5 763 192; 5 723 323; 5 766 886; 5 714 352; 6 204 023; 6 180 370; 5 693 762; 5 530 101; 5 585 089; 5 225 539; 4 816 567, 7 557 189; 7 538 195; y 7 342 110; Solicitudes internacionales N.ºs PCT/US98/16280; PCT/US96/18978; PCT/US91/09630; PCT/US91/05939; PCT/US94/01234; PCT/GB89/01334; PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; Solicitudes internacionales con N.ºs de publicación W090/14443; W090/14424; W090/14430; y patente europea con N.º de publicación N.º EP 229246; incorporándose cada una de las

cuales en su totalidad a modo de referencia, incluidas las referencias citadas en ellas.

Los anticuerpos contra LOX1 humanos antagonistas también se pueden preparar en ratones transgénicos que
5 contienen loci de inmunoglobulina humana que son capaces, tras la inmunización, de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de una producción endógena de inmunoglobulina. Esta estrategia se describe en las patentes de EE. UU. N.^{os} 5 545 807; 5 545 806; 5 569 825;
10 5 625 126; 5 633 425; y 5 661 016.

En ciertos aspectos, el anticuerpo contra LOX1 es un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo. Se conocen diversas técnicas para la producción de fragmentos de un anticuerpo. De manera tradicional, estos anticuerpos se
15 obtienen mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo, Morimoto *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Meth.* 24:107-117 (1993); Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)). En ciertos aspectos, se producen de manera recombinante fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos. Los
20 fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y scFv pueden expresarse todos en *E. coli* u otras células hospedadoras y secretarse a partir de estas, lo que evita por tanto la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. También se pueden aislar tales fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos a
25 partir de las colecciones en fagos de anticuerpos analizados anteriormente. Los fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos también pueden ser anticuerpos lineales como se describe en la patente de EE. UU. N.^o 5 641 870. En la materia se conocen otras técnicas para la producción de fragmentos de
30 anticuerpos.

De acuerdo con la presente divulgación, se pueden adaptar técnicas conocidas en la materia para la producción de anticuerpos monocatenarios específicos para LOX1 (remítase, por ejemplo, a la patente de EE. UU. N.º 4 946 778). Además, se pueden adaptar métodos para la construcción de colecciones de expresión de Fab (remítase, por ejemplo, a Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989)) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada por LOX1. Se pueden producir fragmentos de unión contra LOX1 de anticuerpos mediante técnicas conocidas en la materia que incluyen, sin carácter limitante: (a) un fragmento F(ab')₂ producido mediante la digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (b) un fragmento Fab generado reduciendo los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂, (c) un fragmento Fab generado mediante el tratamiento del anticuerpo contra LOX1 con papaína y un agente reductor, y (d) fragmentos Fv.

En ciertos aspectos, una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) se puede modificar con el fin de aumentar su semivida sérica. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión al receptor de recuperación a la proteína de unión a LOX1 mediante la mutación de la región apropiada en la proteína de unión a LOX1 o mediante la incorporación del epítipo en una etiqueta peptídica que se fusiona a la proteína de unión a LOX1 en cualquier extremo o en la parte central (por ejemplo, mediante síntesis de ADN o peptídica), o mediante mutación YTE. En la técnica se conocen otros métodos para aumentar la semivida sérica de una proteína de

unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1, tal como un anticuerpo contra LOX1 y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos), por ejemplo, conjugación a una molécula heteróloga tal como PEG.

Las proteínas de unión a LOX1 heteroconjugadas (por ejemplo, anticuerpos contra LOX1 tales como anticuerpos contra LOX1 completos y fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos, y variantes y derivados de estos) también están comprendidos en el alcance de la divulgación. Las proteínas de unión a LOX1 heteroconjugadas están compuestas por dos proteínas unidas de manera covalente. Por ejemplo, se ha propuesto que tales proteínas dirigen las células inmunitarias a las células no deseadas (remítase, por ejemplo, a la patente de EE. UU. n.º 4 676 980). Se contempla que las proteínas de unión a LOX1 heteroconjugadas se pueden preparar *in vitro* utilizando métodos conocidos en la química sintética de proteínas, incluidos los que conllevan agentes reticulantes. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptobutirimidato.

Los anticuerpos contra LOX1 modificados tales como anticuerpos contra LOX1 completos y fragmentos de unión a LOX1 anticuerpos, y variantes y derivados de estos, tal como se proporcionan en la presente pueden comprender cualquier tipo de región variable que haga posible la asociación del anticuerpo con LOX1. En este sentido, la región variable puede comprender o derivarse de cualquier tipo de mamífero en el que se pueda inducir la aparición de una respuesta

humoral y la generación de inmunoglobulinas contra el antígeno de LOX1. Por lo tanto, la región variable de un anticuerpo contra LOX1 puede proceder, por ejemplo, de seres humanos, roedores, primate no humano (por ejemplo, monos cinomolgos, macacos, etc.) o lobos. En algunos aspectos, la
5 regiones variable y constante de los anticuerpos contra LOX1 modificados son humanas. En otros aspectos, las regiones variables de anticuerpos compatibles (normalmente obtenidos a partir de una fuente no humana) se pueden manipular o personalizar de manera específica para mejorar las
10 propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. En este sentido, las regiones variables útiles de acuerdo con la divulgación se pueden humanizar o alterar de otra manera mediante la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.
15

En ciertos aspectos, los dominios variables en las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo contra LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de
20 estos) se pueden alterar reemplazando al menos parcialmente una o más CDR y/o reemplazando parcialmente la región de armazón y cambiando la secuencia. Aunque las CDR se pueden obtener a partir de la misma clase o incluso subclase del anticuerpo a partir del cual se obtienen las regiones de
25 armazón, se contempla que las CDR se obtengan de un anticuerpo de una clase diferente y, en ciertos aspectos, de un anticuerpo de una especie diferente. No es necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donante para transferir la capacidad de unión al
30 antígeno de un dominio variable a otro. En su lugar, tan solo es necesario transferir aquellos residuos que son

necesarios para mantener la actividad del sitio de unión al antígeno. Con las explicaciones expuestas en las patentes de EE. UU. N.^{os} 5 585 089, 5 693 761 y 5 693 762, estará totalmente dentro de las competencias de los expertos en la técnica, ya sea llevando a cabo la experimentación habitual o mediante ensayos de prueba y error, obtener un anticuerpo funcional con una inmunogenicidad reducida.

A pesar de las alteraciones en la región variable, los expertos en la técnica comprenderán que los anticuerpos contra LOX1 modificados (por ejemplo, anticuerpos contra LOX1 completos y fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos, y variantes y derivados de estos) de la divulgación comprenderán anticuerpos en los cuales al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante se han eliminado o alterado de otra manera de manera para que se obtengan las características bioquímicas deseadas, tales como una mayor ubicación en el tumor o una menor semivida sérica cuando se comparan con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante natural o no alterada. En algunos aspectos, la región constante de los anticuerpos contra LOX1 modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones de la región constante pueden incluir adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los anticuerpos contra LOX1 modificados divulgados en la presente pueden comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o el dominio constante de la cadena ligera (CL). En algunos aspectos, se contemplan anticuerpos contra LOX1 modificados que comprenderán regiones constantes en las que

uno o más dominios se han eliminado parcial o totalmente. En algunos aspectos, los anticuerpos contra LOX1 modificados comprenderán variantes o constructos con dominios eliminados donde el dominio CH2 en su totalidad se ha eliminado
5 (constructos Δ CH2). En algunos aspectos, el dominio de la región constante que se ha omitido puede ser reemplazado por un espaciador corto de aminoácidos (por ejemplo, 10 residuos) que proporciona parte de la flexibilidad molecular que normalmente confiere la región constante ausente.

10 Aparte de su configuración, en la técnica se sabe que la región constante media varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a los anticuerpos activa el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y la lisis
15 de los patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede participar en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a las células mediante la región Fc, donde un sitio para el receptor de Fc en la región Fc del
20 anticuerpo se une a un receptor de Fc (FcR) en una célula. Existen varios receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluidas las IgG (receptores γ), IgE (receptores η), IgA (receptores α) e IgM (receptores μ). La unión del anticuerpo a los receptores Fc
25 de la superficie celular desencadena varias respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la absorción y la destrucción de las partículas recubiertas de anticuerpos, la lisis de células diana recubiertas por anticuerpos por parte de los linfocitos citolíticos (que se
30 denomina citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios,

transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulinas.

En ciertos aspectos, un anticuerpo contra LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) tiene una función efectora alterada que, a su vez, afecta al perfil biológico del anticuerpo contra LOX1 administrado. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (mediante mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado circulante. En otros casos, las modificaciones a la región constante pueden moderar la unión al complemento y, por lo tanto, reducen la semivida sérica y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Sin embargo, se pueden utilizar otras modificaciones de la región constante para eliminar las uniones de disulfuro o los restos oligosacarídicos que permiten una mejor ubicación debido a una mayor especificidad por antígeno o flexible al anticuerpo. De manera similar, las modificaciones de la región constante de acuerdo con esta divulgación se pueden realizar fácilmente utilizando técnicas bioquímicas o de manipulación molecular muy conocidas, totalmente comprendidas dentro del ámbito del experto.

En algunos aspectos, una proteína de unión a LOX1 que se proporciona en la presente es un anticuerpo contra LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) que no tiene una o más funciones efectuadas. Por ejemplo, en algunos aspectos, el anticuerpo contra LOX1 no presenta actividad por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o no presenta actividad

por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En ciertos aspectos, el anticuerpo contra LOX1 no se une a un receptor de Fc y/o factores del complemento. En ciertos aspectos, el anticuerpo contra LOX1 no tiene función
5 efectora.

En algunos aspectos, un anticuerpo contra LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) se manipula para que se fusione directamente con el
10 dominio CH3 de la región bisagra del anticuerpo modificado respectivo. En otros constructos, se inserta un espaciador peptídico entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, pueden expresarse constructos compatibles en los que el dominio CH2 se ha eliminado y el
15 dominio CH3 restante (modificado o no modificado) se une a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Puede añadirse un espaciador de este tipo, por ejemplo, para garantizar que los elementos reguladores del dominio constante sigan estando libres y accesibles o que la región
20 bisagra siga siendo flexible. En algunos casos, se ha demostrado que los espaciadores de aminoácidos son inmunógenos y suscitan una respuesta inmunitaria no deseada contra el constructo. En consecuencia, en ciertos aspectos, cualquier espaciador añadido al constructo puede ser
25 relativamente no inmunógeno, o incluso se puede omitir por completo, de manera que se mantengan las cualidades bioquímicas deseadas del anticuerpo contra LOX1 modificado.

Además de la eliminación de dominios de la región constante al completo, los anticuerpos contra LOX1 (por
30 ejemplo, anticuerpos contra LOX1 completos y fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos, y variantes y derivados de

estos), se pueden modificar mediante la delección parcial o sustitución de unos pocos aminoácidos, o incluso de uno solo, en una región constante. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en las zonas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir de manera sustancial la unión a Fc y de este modo. De manera similar, se pueden eliminar total o parcialmente uno o más dominios de la región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, la unión al complemento C1Q). Tales delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas de los anticuerpos contra LOX1 antagonistas (por ejemplo, la semivida sérica) a la vez que dejan otras funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante correspondiente intactas. Además, las regiones constantes de los anticuerpos contra LOX1 que se proporcionan en la presente se puede modificar a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que potencia el perfil del constructo resultante. En este sentido, es posible alterar la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, la unión a Fc) a la vez que se mantiene de manera sustancial la configuración y el perfil inmunógeno del anticuerpo contra LOX1 modificado. La divulgación también proporciona un anticuerpo contra LOX1 que contiene la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar las características deseables, tal como disminuir o aumentar la función efectora o proporcionar sitios de unión a más restos de carbohidratos, de marcaje o de citotoxinas. En tales aspectos, puede resultar deseable insertar o replicar secuencias específicas obtenidas a partir de dominios de la región constante seleccionados.

La divulgación también se refiere a variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogos en estructura y/o similares en una o más funciones, a los anticuerpos contra LOX1 divulgados en la presente (por ejemplo, proteínas de unión a LOX1 murinas, quiméricas, humanizadas y humanas). Estas variantes pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución de residuos aminoacídicos conservadoras. Tal como se sobreentiende de manera general en la técnica, una sustitución de un residuo aminoacídico conservadora se refiere a la sustitución de un residuo aminoacídico por otro de la misma clase general tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico por otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro. En la técnica se sabe lo que se pretende decir con una sustitución de aminoácidos conservadora.

Las proteínas de unión a LOX1 tales como los anticuerpos contra LOX1 que se proporcionan en la presente se pueden derivatizar para que contengan restos químicos adicionales que, normalmente, no son parte de la proteína. En la técnica, existe constancia de tales restos de derivatización y pueden servir para mejorar, por ejemplo, la solubilidad, semivida biológica, biodisponibilidad y mejorar de otra manera la estabilidad, formulación y/o propiedades terapéuticas de la proteína de unión a LOX1. Se puede consultar una revisión no exhaustiva de tales restos, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20.^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

VI. Ácidos nucleicos que codifican proteínas de unión a LOX1 y su expresión

Esta divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de unión a LOX1 (remítase, por ejemplo, a las descritas en la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5) incluidos los anticuerpos contra LOX1 tales como los anticuerpos contra LOX1 completos, los fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos, y variantes y derivados de estos. Las moléculas de ácido nucleico divulgadas en la presente pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético; y puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la hebra codificante o la hebra no codificante (antisentido). En determinados aspectos, la molécula de ácido nucleico está aislada. En aspectos adicionales, una molécula de ácido nucleico está sustancialmente pura. En algunos aspectos, el ácido nucleico es ADNc o se deriva a partir de ADNc. En algunos aspectos, el ácido nucleico se produce de manera recombinante.

En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia que codifica una proteína de unión a LOX1 ligada operablemente a una secuencia de control que controla la expresión de la secuencia codificante en una célula hospedadora o *in vitro*. En aspectos particulares, la secuencia codificante es un ADNc. La divulgación también se refiere a vectores que contienen moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia que codifica una proteína de unión a LOX1 ligada operablemente a una secuencia de control que controla la expresión de la secuencia codificante en una célula hospedadora o *in vitro*.

En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia codificante para una proteína de unión a LOX1 madura que se fusiona en el mismo marco de

lectura con una secuencia polinucleotídica heteróloga. En algunos aspectos, la secuencia polinucleotídica heteróloga codifica una secuencia del péptido líder que facilita la secreción de la proteína expresada desde la célula
5 hospedadora transformada con la molécula de ácido nucleico que codifica LOX1. Una proteína que contiene una secuencia líder se denomina preproteína y la célula hospedadora puede escindir la secuencia líder para formar la forma madura del polipéptido. En general, en la técnica existe constancia de
10 tales secuencias del péptido líder y su uso en las células hospedadoras para facilitar la secreción de las proteínas recombinantes. En aspectos adicionales, la secuencia polinucleotídica heteróloga codifica residuos aminoacídicos adicionales en 5' y/o 3' que pueden servir, por ejemplo,
15 para facilitar la purificación, añadir o mejorar la estabilidad proteica y/o las propiedades diagnósticas o terapéuticas de la proteína de unión a LOX1 expresada de manera recombinante.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona ácidos
20 nucleicos aislados tales como una molécula de ADNc suficiente para su uso como una sonda de hibridación, cebador de PCR o cebador de la secuenciación.

En ciertos aspectos, en la divulgación se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica una
25 región variable de la cadena ligera (VL), donde la VL comprende secuencias de aminoácidos de CDR1-VL, CDR2-VL y CDR3-VL idénticas a la SEQ ID NO:30; la SEQ ID NO:31; o la SEQ ID NO:32, 34 o 35, respectivamente, o tiene un total de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos
30 sustituciones de aminoácidos en una o más de las CDR-VL respecto a ellas. En otros aspectos, en la divulgación se

proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica una región variable de la cadena ligera (VL), donde la VL comprende secuencias de aminoácidos de CDR1-VL, CDR2-VL y CDR3-VL idénticas a la SEQ ID NO:55 o 59; la SEQ ID NO:56 o 60; o la SEQ ID NO:57, 61-63 o 64, respectivamente, o tiene un total de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones de aminoácidos en una o más de las CDR-VL respecto a ellas.

En la divulgación se proporciona además una molécula de ácido nucleico aislado que codifica una región variable de la cadena pesada (VH), donde la VH comprende secuencias de aminoácidos de CDR1-VH, CDR2-VH y CDR3-VH que son idénticas a la SEQ ID NO:1; la SEQ ID NO:2, 5-12 o 13; y la SEQ ID NO:3, 14-17 o 18, respectivamente, o tiene un total de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones de aminoácidos en una o más de las CDR-VH respecto a ellas. En otros aspectos, en la divulgación se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica una región variable de la cadena pesada (VH), donde la VH comprende secuencias aminoacídicas de CDR1-VH, CDR2-VH y CDR3-VH que son idénticas a la SEQ ID NO:38; la SEQ ID NO:39, 42 o 43; y la SEQ ID NO: 40, 44-46 o 47, respectivamente, o tiene un total de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o menos sustituciones de aminoácidos en una o más de las CDR-VL respecto a ellas.

En la divulgación se proporciona además un ácido nucleico aislado tal como un ADNc, que codifica una región variable de la cadena ligera (VL), donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o un 100% de identidad secuencial con una secuencia de aminoácidos de referencia

seleccionada a partir del grupo constituido por la SEQ ID NO:33, la SEQ ID NO:36 y la SEQ ID NO:37. En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico aislado codifica una región variable de la cadena ligera (VL), donde la VL comprende una
5 secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90%, 95%, 97%, 98% o un 99% de identidad secuencial con la secuencia de aminoácidos de referencia.

Además, en la divulgación se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica una región variable
10 de la cadena pesada (VH), donde la VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o un 100% de identidad secuencial con una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada a partir grupo constituido por la SEQ ID NO:4,
15 19-28 y 29. En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico aislado codifica una región variable de la cadena pesada (VH), donde la VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90%, 95%, 97%, 98% o un 99% de identidad secuencia con la secuencia de aminoácidos
20 de referencia.

En ciertos aspectos, en la divulgación se proporciona una molécula de ácido nucleico o una combinación de moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, las proteínas de unión a LOX1 descritas en la
25 Tabla 1, Figura 4 o Figura 5) que se unen de manera específica a LOX1. Se proporciona además un vector que comprende una molécula nucleica tal como ADNc o una combinación de moléculas de ácido nucleico, tal como se describe en la presente. Los vectores adecuados se describen en otra sección
30 de la presente y son conocidos en la técnica.

En ciertos aspectos, la región variable de la cadena pesada (VH) y la región variable de la cadena ligera (VL) están codificadas por secuencias de ácido nucleico que tienen al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o un 100% de identidad secuencial con las secuencias de ácido nucleico de referencia que codifican la SEQ ID NO:4 y la SEQ ID NO:33, la SEQ ID NO:23 y la SEQ ID NO:36, o la SEQ ID NO:27 y la SEQ ID NO:37, respectivamente. En un aspecto particular, la proteína de unión a LOX1 aislada (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) está codificado por secuencias de ácido nucleico que codifican la SEQ ID NO:4 y la SEQ ID NO:33, respectivamente.

En la divulgación se proporciona además un ácido nucleico aislado tal como un ADNc, que codifica una región variable de la cadena ligera (VL), donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o un 100% de identidad secuencial con una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada a partir grupo constituido por la SEQ ID NO:58, 65-69 y 70. En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico aislado codifica una región variable de la cadena ligera (VL), donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90%, 95%, 97%, 98% o un 99% de identidad secuencial con la secuencia de aminoácidos de referencia.

En la divulgación también se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica una región variable de la cadena pesada (VH), donde la VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o un 100% de identidad secuencial con una secuencia de aminoácidos de referencia

seleccionada a partir grupo constituido por la SEQ ID N0:41, 48-53 y 54. En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico aislado codifica una región variable de la cadena pesada (VH), donde la VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90%, 95%, 97%, 98% o un 99% de identidad secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia.

En ciertos aspectos, la región variable de la cadena pesada (VH) y la región variable de la cadena ligera (VL) están codificadas por secuencias de ácido nucleico que tienen al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o un 100% de identidad secuencial con las secuencias de ácido nucleico de referencia que codifican la SEQ ID N0:54 y la SEQ ID N0:70, la SEQ ID N0:41 y la SEQ ID N0:58, la SEQ ID N0:48 y la SEQ ID N0:65, la SEQ ID N0:49 y la SEQ ID N0:66, la SEQ ID N0:50 y la SEQ ID N0:67, o la SEQ ID N0:53 y la SEQ ID N0:58, respectivamente. En un aspecto particular, la proteína de unión a LOX1 aislada (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) está codificado por secuencias de ácido nucleico que codifican la SEQ ID N0:41 y la SEQ ID N0:58, respectivamente.

En algunos aspectos, el ácido nucleico aislado codifica una proteína de unión a LOX1 que comprende un conjunto de CDR: CDR1-VH, CDR2-VH, CDR3-VH, CDR1-VL, CDR3-VL y CDR3-VL descritas en la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5. En algunos aspectos adicionales, el ácido nucleico aislado codifica una proteína de unión a LOX1 que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena ligera (VL) descritas en la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5.

En una composición de moléculas de ácido nucleico tal como se ha descrito anteriormente, el ácido nucleico que

codifica una VH y el ácido nucleico que codifica una VL pueden estar alojados en un vector único o pueden estar en vectores independientes. En consecuencia, en la divulgación se proporcionan uno o más vectores que comprenden la
5 composición de moléculas de ácido nucleico o la combinación de moléculas de ácido nucleico tal como se ha descrito anteriormente.

En algunos casos, una composición polinucleotídica que codifica una VH y una VL tal como se han descrito
10 anteriormente puede codificar un anticuerpo (incluido un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo) que se une específicamente a LOX1, por ejemplo, LOX1 humano y de mono cinomolgo. En algunos aspectos, la composición polinucleotídica codifica un anticuerpo que se une de manera
15 específica al mismo epítipo que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que comprende una VH y VL de la SEQ ID NO:4 y la SEQ ID NO:33, respectivamente. En otros aspectos, la composición polinucleotídica codifica un anticuerpo que se une de manera específica al mismo epítipo que un
20 anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que comprende una VH y VL de la SEQ ID NO:41 y la SEQ ID NO:58, respectivamente. En algunos aspectos adicionales, la composición polinucleotídica codifica un anticuerpo que se une de manera específica al mismo epítipo que una proteína
25 de unión a LOX1 que comprende una región variable de la cadena pesada (VH) y una región variable de la cadena ligera (VL) descritas en la Tabla 1, Figura 4 o Figura 5.

En aspectos adicionales, la divulgación proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico o ácidos
30 nucleicos o el vector como los proporcionados anteriormente, donde la célula hospedadora puede, en algunos casos expresar

una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) que se unen de manera específica a LOX1.

- 5 Una célula hospedadora de este tipo se puede utilizar en un método de producción de una proteína de unión a LOX1 como se proporciona en la presente, donde el método incluye (a) cultivar la célula hospedadora y (b) aislar las proteínas de unión a LOX1 expresadas a partir de la célula hospedadora.

- 10 En la divulgación también se proporciona un método para producir una proteína de unión a LOX1 que comprende cultivar una célula hospedadora o hibridoma capaz de expresar la proteína de unión a LOX1 en condiciones adecuadas y, opcionalmente, proporciona un método para aislar la proteína de unión a LOX1 secretada a partir de la célula hospedadora o el hibridoma. Además, en la divulgación se proporciona además la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este), aislado después de haber sido secretado por la célula hospedadora o
- 15
- 20 hibridoma utilizando los métodos divulgados.

- En ciertos aspectos, los polinucleótidos comprenden la secuencia o secuencias que codifican la proteína o proteínas de unión a LOX1 maduras (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1, tal como un anticuerpo completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo) fusionados en el mismo marco de lectura con una secuencia marcadora que permite, por ejemplo, la purificación del polipéptido codificado. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexahistidina suministrada por un vector pQE-9 para hacer posible la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un hospedador bacteriano o la secuencia marcadora
- 25
- 30

puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) obtenida a partir de la proteína hemaglutinina gripal cuando se utiliza un hospedador mamífero (por ejemplo, células COS-7).

También se proporcionan las variantes de ácido nucleico que codifican una proteína de unión a LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo. Las variantes del ácido nucleico pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o ambas. En algunos aspectos, las variantes del ácido nucleico contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones silenciosas, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunos aspectos, se producen variantes del ácido nucleico mediante sustituciones silenciosas debidas a la degeneración del código genético. Se pueden producir variantes del ácido nucleico por varios motivos, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un hospedador particular (cambiar codones en el ARNm humano por los preferidos por un hospedador bacteriano tal como *E. coli*). También se proporcionan los vectores y células que comprenden los ácidos nucleicos descritos en la presente.

En algunos aspectos, se genera una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo) mediante síntesis química utilizando un sintetizador de oligonucleótidos. Tales oligonucleótidos se pueden diseñar en función de la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y la optimización de codones en función de las preferencias de la célula hospedadora. Se pueden aplicar de manera habitual métodos estándar para sintetizar y aislar

secuencias polinucleotídicas que codifican proteínas de unión a LOX1.

Una vez ensambladas (por síntesis, mutagénesis dirigida al sitio u otro método), las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de unión a LOX1 se pueden ligar operablemente de manera habitual a una secuencia de control apropiada para la expresión de las proteínas de unión a LOX1 en un hospedador deseado. En algunos aspectos, las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de unión a LOX1 se insertan en un vector de expresión y se ligan operablemente a una secuencia de control apropiada para la expresión de la proteína en un hospedador deseado. Con el fin de obtener un nivel elevado de expresión de un gen que se ha transfectado en un hospedador, el gen se puede ligar operablemente a secuencias de control transcripcional y traduccional de la expresión que son funcionales en el hospedador de expresión elegido, o se puede asociar con ellas.

En ciertos aspectos, los vectores de expresión recombinantes se utilizan para amplificar y expresar ADN que codifica una proteína de unión a LOX1, tal como un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo. Los vectores de expresión recombinantes son constructos de ADN replicable que tienen fragmentos de ADN sintéticos u obtenidos a partir de ADNc que codifican una cadena polipeptídica de una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo) ligados operablemente a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados obtenidos a partir de genes de mamíferos, microbios, virus o insectos. Una unidad

transcripcional comprende por lo general un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen una función reguladora en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores transcripcionales, (2) una secuencia

5 estructural o codificante que se transcribe para obtener ARNm y se traduce para obtener una proteína, y (3) secuencias de iniciación y terminación de la transcripción y la traducción apropiadas, tal como se describe en detalle a continuación. Tales elementos reguladores pueden incluir una

10 secuencia operadora para controlar la transcripción. De manera adicional, se puede incorporar la capacidad de replicarse en un hospedador, que normalmente confiere un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes. Las regiones de ADN

15 están ligadas operablemente cuando están relacionadas desde un punto de vista funcional entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (líder secretor) está ligado operablemente al ADN de un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un

20 promotor está ligado operablemente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está ligado operablmente a una secuencia codificante si está ubicado de modo que se permita la traducción. Los elementos estructurales destinados para

25 su uso en sistemas de expresión en levaduras incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de proteína traducida por una célula hospedadora. Como alternativa, cuando se expresa una proteína recombinante sin una secuencia líder o de transporte, la proteína puede

30 incluir un residuo de metionina N-terminal. De manera opcional, este residuo puede escindirse posteriormente de la

proteína recombinante expresada para proporcionar la proteína final. En ciertos aspectos, en la divulgación se proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico o vector tal como se ha descrito anteriormente o en otra sección de la presente, que además comprende de manera opcional uno o más portadores, diluyentes, excipientes u otros aditivos.

También se proporciona una célula hospedadora transformada con la molécula de ácido nucleico o molécula de ADNc y/o los vectores divulgados en la presente. La divulgación también proporciona células hospedadoras transformadas con la molécula o moléculas de ácido nucleico divulgadas ligadas operablemente a una secuencia de control y, de manera opcional, insertadas en un vector. En algunos aspectos, la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamíferos. En aspectos adicionales, la célula hospedadora de mamíferos es una célula de mieloma murino NS0, una célula humana PER.C6® o una célula de ovario de hámster chino (CHO). En otros aspectos, la célula hospedadora es un hibridoma.

De manera adicional, las células hospedadoras que expresan ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión a LOX1 divulgadas en la presente son hibridomas que producen una proteína de unión a LOX1.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporciona un método para generar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) proporcionada en la presente que comprende cultivar una célula hospedadora transformada o un hibridoma divulgado en la presente en condiciones adecuadas para producir la

proteína de unión a LOX1. De manera opcional, en la divulgación se proporciona el aislamiento de la proteína de unión a LOX1 secretada a partir de la célula hospedadora o hibridoma. De manera opcional, en la divulgación también se proporciona la proteína de unión a LOX1 producida utilizando este método y las composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína de unión a LOX1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

La elección de la secuencia de control de la expresión y el vector de expresión dependerá de la elección del huésped. Puede emplearse una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas, incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para hospedadores bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *E. coli*, que incluyen pCR 1, pBR322, pMB9 y sus derivados, y también plásmidos con una gama de hospedadores más amplia, tales como M13 y fagos filamentosos de ADN monocatenario.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) incluyen células procariotas, de levaduras, insectos o eucariotas superiores controladas por los promotores apropiados. Las procariotas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero tal como se

describe a continuación. También podrían emplearse sistemas de traducción sin células. Se puede consultar información adicional respecto a los métodos de producción de proteínas, incluida la producción de anticuerpos, en la publicación de solicitud de EE. UU. N.º 2008/0187954, las patentes de EE. UU. N.ºs 6 413 746 y 6 660 501, y la publicación de solicitud internacional N.º WO 04009823, incorporándose cada una de las cuales por la presente a modo de referencia a la presente en su totalidad.

10 También se pueden emplear de manera conveniente varios sistemas de cultivo de células de mamíferos o de insectos para expresar la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y
15 variantes y derivados de estos). Se puede realizar la expresión de las proteínas de unión a LOX1 recombinantes en células de mamíferos porque tales proteínas se pliegan por lo general de manera correcta, se modifican de manera apropiada y son completamente funcionales. Los ejemplos de
20 líneas de células hospedadoras de mamíferos adecuadas incluyen HEK-293 y HEK-293T, las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (*Cell* 23:175, 1981), y otras líneas celulares que incluyen, por ejemplo, células L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), HeLa y líneas
25 celulares BHK. Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados ligados al gen que va a expresarse, y otras secuencias no transcritas flanqueantes en 5' o 3', y secuencias no traducidas en 5' o
30 3', tales como sitios de unión al ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios de corte y empalme donadores

y aceptores, y secuencias de terminación de la transcripción. Luckow y Summers, BioTechnology 6:47 (1988), han realizado una revisión de los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto.

5 Las proteínas de unión a LOX1 (por ejemplo, los anticuerpos contra LOX1 tales como anticuerpos contra LOX1 completos y fragmentos de unión a LOX1 de anticuerpos, y variantes y derivados de estos) producidas por un hibridoma u hospedador transformado se pueden purificar de acuerdo con
10 cualquier método adecuado. Tales métodos estándar incluyen la cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la
15 purificación de proteínas. Pueden unirse etiquetas de afinidad tales como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de revestimiento gripal y glutatión-S-transferasa, a la proteína para permitir una fácil purificación mediante el paso por una columna de afinidad
20 adecuada. También se pueden caracterizar físicamente proteínas de unión a LOX1 aisladas utilizando técnicas tales como proteólisis, resonancia magnética nuclear o cristalografía de rayos X.

Por ejemplo, se pueden concentrar en primer lugar los
25 sobrenadantes de sistemas que secretan las proteínas de unión a LOX1 recombinantes en medios de cultivo utilizando un filtro de concentración de proteínas comercializado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la etapa de concentración, se puede aplicar
30 el concentrado a una matriz de purificación adecuada. Como alternativa, se puede emplear también una resina de

intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o un sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) laterales. Las matrices pueden ser de acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos empleados comúnmente en la purificación de proteínas. Como alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) empleando medios de RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos laterales, para purificar adicionalmente una proteína de unión a LOX1. También se pueden emplear de manera habitual algunas o todas las etapas de purificación anteriores, combinadas de diferentes maneras, para proporcionar proteínas de unión a LOX1 recombinantes homogéneas.

Se puede aislar una molécula de unión a LOX1 recombinante (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) producida en un cultivo bacteriano, por ejemplo, mediante extracción inicial de sedimentos celulares, seguida por una o más etapas de concentración, precipitación con sales, cromatografía de exclusión por tamaño o intercambio iónico acuoso. Se puede emplear la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para las etapas de purificación finales. Se puede alterar la integridad física de las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante mediante cualquier método conveniente,

incluidos ciclos de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica de la integridad física o el uso de agentes de lisado celular.

Los métodos conocidos en la técnica para purificar
5 proteínas de unión objetivo tales como anticuerpo completos y fragmentos de unión al antígeno del anticuerpo también incluyen, por ejemplo, los descritos en las publicaciones de solicitud de EE. UU. N.º 2008/0312425, 2008/0177048 y 2009/0187005, incorporándose cada una de las cuales por la
10 presente a modo de referencia a la presente en su totalidad.

VII. Métodos de tratamiento que utilizan proteínas de unión a LOX1 terapéuticas

Se proporcionan métodos para el uso de una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal
15 como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) para tratar a sujetos que padecen una enfermedad asociada con LOX1, la actividad de LOX1 y/o la expresión de LOX1. En la técnica se conocen métodos para detectar la
20 expresión de LOX1 e incluyen, sin carácter limitante, técnicas de PCR, inmunohistoquímica, citometría de flujo, inmunoelectrotransferencia, ELISA y similares.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporciona una composición farmacéutica que contiene una
25 proteína de unión a LOX1 proporcionada en la presente (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos, en la divulgación se proporciona una composición farmacéutica que contiene una proteína de unión a LOX1 y un
30 portador farmacéuticamente aceptable, para su uso como un medicamento. En la divulgación también se proporciona el uso

de las composiciones farmacéuticas para tratar, prevenir y/o mejorar una enfermedad o afección asociada con LOX1, la actividad de LOX1, la expresión de LOX1 y/o la reducción de la señalización mediada por HDL. En algunos aspectos, la enfermedad o afección tratada utilizando las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente es la aterosclerosis, trombosis, CAD, isquemia (por ejemplo, isquemia de miocardio), infarto (por ejemplo, infarto de miocardio), síndrome coronario agudo (ACS), accidente cerebrovascular, lesión por reperfusión, reestenosis, enfermedad vascular periférica, hipertensión, insuficiencia cardíaca, inflamación (por ejemplo, inflamación crónica), angiogénesis, preeclampsia y/o cáncer.

En algunos aspectos, una composición farmacéutica contiene una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos), un portador farmacéuticamente aceptable y comprende además un grupo marcador o un grupo efector. Una "marca", tal como se utiliza en la presente, se refiere a uno o más elementos, isótopos o compuestos químicos unidos para hacer posible la detección en un cribado. Por lo general, las marcas se agrupan en tres clases: (a) marcas isotópicas que pueden ser isótopos pesados o radioactivos, (b) marcas que son moléculas con un peso molecular bajo, las cuales pueden incluir tintes fluorescentes y colorimétricos, o moléculas tales como biotina que posibilitan otros métodos de marcado, y (c) marcas inmunitarias, que pueden ser un epítipo incorporado como un compañero de fusión que es reconocido por el anticuerpo. El "grupo marcador" se refiere a cualquier marca

detectable. En algunos aspectos, el grupo marcador está acoplado a la proteína de unión a LOX1 mediante un espaciador (por ejemplo, un espaciador peptídico) para reducir un posible impedimento estérico. Las marcas se pueden
5 incorporar al compuesto en cualquier posición y se pueden incorporar *in vitro* o *in vivo* durante la expresión de la proteína. En la técnica se conocen varios métodos para marcar proteínas y se pueden utilizar para realizar los métodos proporcionados. En aspectos adicionales, el grupo marcador
10 se selecciona a partir del grupo constituido por: marcas isotópicas, marcas magnéticas, restos redox activos, tintes ópticos, grupos biotinilados y epítomos polipeptídicos reconocidos por un indicador secundario. En algunos aspectos, el grupo marcador es una proteína fluorescente tal
15 como una proteína fluorescente verde o un derivado de esta (por ejemplo, GFP potenciada, proteína fluorescente azul o un derivado de esta (por ejemplo, EBFP (proteína fluorescente azul potenciada), EBFP2, azurita, mKalamal, proteína fluorescente cian o un derivado de esta (por ejemplo, ECFP
20 (proteína fluorescente cian potenciada), cerúleo, Cypet), proteína fluorescente amarilla o un derivado de esta (por ejemplo, YFP, citrina, venus, YPet). En algunos aspectos, el epítomo polipeptídico es un miembro seleccionado entre un péptido señalizador de biotina, péptido de histidina (his),
25 hemaglutinina (HA), Flag o péptido de unión a oro. En aspectos adicionales, el grupo efector se selecciona a partir del grupo constituido por un radioisótopo, radionúclido, una toxina, un agente terapéutico y un agente quimioterápico.

En otros aspectos, el grupo efector se selecciona a
30 partir del grupo constituido por un radioisótopo,

radionúclido, una toxina, un agente terapéutico y un agente quimioterápico.

El siguiente análisis se refiere a métodos diagnósticos y métodos para tratar, prevenir y/o mejorar diversas enfermedades y afecciones con una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos). En algunos aspectos, las proteínas de unión a LOX1 son anticuerpos humanos, murinos o humanizados.

En un aspecto, con la divulgación se hace posible el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad o afección que comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) a un sujeto que padece la enfermedad o afección o que está en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección asociada con LOX1. En otro aspecto, el tratamiento incluye la administración de una proteína de unión a LOX1 a un tejido o célula aislado procedente de un paciente, donde el sujeto padece una enfermedad o afección, o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección, asociada con LOX1.

En la divulgación, también se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar una enfermedad o afección asociada con la aterosclerosis, trombosis, CAD, isquemia (por ejemplo, isquemia de miocardio), infarto (por ejemplo, infarto de miocardio), síndrome coronario agudo (ACS), accidente cerebrovascular, lesión por reperusión, reestenosis, enfermedad vascular periférica, hipertensión, insuficiencia cardíaca, inflamación (por ejemplo,

inflamación crónica), angiogénesis, preeclampsia y cáncer en un sujeto. En algunos aspectos, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos). En aspectos adicionales, la proteína de unión a LOX1 se administra sola o como una terapia combinada.

En la divulgación también se proporcionan métodos para reducir o inhibir la actividad de LOX1 y/o estimular o aumentar la señalización mediada por HDL en un sujeto. En algunos aspectos, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite (por ejemplo, un sujeto al que se le ha diagnosticado aterosclerosis, trombosis, CAD, isquemia (por ejemplo, isquemia de miocardio), infarto (por ejemplo, infarto de miocardio), síndrome coronario agudo (ACS), accidente cerebrovascular, lesión por reperfusión, reestenosis, enfermedad vascular periférica, hipertensión, insuficiencia cardíaca, inflamación (por ejemplo, inflamación crónica), angiogénesis, preeclampsia y/o cáncer), una cantidad eficaz de una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos).

De manera adicional, se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la aterosclerosis. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece aterosclerosis. En otros

aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) está en riesgo de desarrollar aterosclerosis. En algunos aspectos, el sujeto padece una

5 afección proaterógena. En aspectos adicionales, la afección proaterógena es lupus sistémico eritematoso (SLE), diabetes, hipertensión, hiperglucemia, insuficiencia cardíaca, lesión vascular, trasplante de órgano, dislipidemia (por ejemplo, hiperlipidemia), inflamación (por ejemplo, inflamación

10 crónica e inflamación inducida por endotoxinas) y/o infección bacteriana. También se proporcionan métodos para reducir la aterosclerosis. En algunos casos, en la divulgación se proporciona un método para reducir la aterosclerosis en un sujeto que comprende administrar una

15 proteína de unión a LOX1 a un sujeto que padece aterosclerosis.

También se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la trombosis. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por

20 ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) a un sujeto que padece trombosis. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 está en riesgo de desarrollar trombosis. En algunos aspectos, la trombosis es una trombosis arterial. En aspectos

25 adicionales, la trombosis es una trombosis venosa profunda.

En la divulgación también se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la arteriopatía coronaria (CAD) o una afección asociada con la CAD. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1

30 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente)

a un sujeto que padece CAD. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 está en riesgo de desarrollar CAD. En algunos aspectos, el sujeto padece una afección proaterógena. En aspectos adicionales, la afección proaterógena es lupus sistémico eritematoso (SLE), diabetes, hipertensión, hiperglucemia, insuficiencia cardiaca, lesión vascular, trasplante de órgano, dislipidemia (por ejemplo, hiperlipidemia), inflamación (por ejemplo, inflamación crónica e inflamación inducida por endotoxinas) y/o infección bacteriana.

En la divulgación también se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la isquemia o una afección asociada con la isquemia. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece una isquemia. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 está en riesgo de desarrollar una isquemia. En algunos aspectos, el sujeto padece una isquemia de miocardio. En otros aspectos, el sujeto está en riesgo de desarrollar una isquemia de miocardio. En aspectos adicionales, el sujeto padece lupus sistémico eritematoso (SLE), diabetes, hipertensión, hiperglucemia, insuficiencia cardiaca, lesión vascular, trasplante de órgano, dislipidemia (por ejemplo, hiperlipidemia), inflamación (por ejemplo, inflamación crónica e inflamación inducida por endotoxinas) y/o una infección bacteriana.

También se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar un infarto o una afección asociada con un infarto. En algunos casos, el método comprende administrar

una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece un infarto. En otros aspectos, el sujeto al que se le
5 administra la proteína de unión a LOX1 está en riesgo de desarrollar un infarto. En algunos aspectos, el sujeto padece un infarto de miocardio. En otros aspectos, el sujeto está en riesgo de desarrollar un infarto de miocardio. En aspectos adicionales, el sujeto padece isquemia, lupus sistémico
10 eritematoso (SLE), diabetes, hipertensión, hiperglucemia, insuficiencia cardíaca, lesión vascular, trasplante de órgano, dislipidemia (por ejemplo, hiperlipidemia), inflamación (por ejemplo, inflamación crónica e inflamación inducida por endotoxinas) y/o una infección bacteriana.

15 En la divulgación también se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar el síndrome coronario agudo (ACS) o una ficción asociada con el ACS. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de
20 este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece un ACS. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 está en riesgo de desarrollar un ACS. En algunos aspectos, el sujeto presenta una cantidad sérica elevada de sLOX1 o una actividad
25 de LOX1 elevada. En aspectos adicionales, el sujeto padece aterosclerosis.

En la divulgación también se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar un accidente cerebrovascular o una afección asociada con un accidente cerebrovascular. En
30 algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un

fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que ha padecido un accidente cerebrovascular. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 está en riesgo de padecer un accidente cerebrovascular. En algunos aspectos, el sujeto presenta una cantidad sérica elevada de sLOX1 o una actividad de LOX1 elevada. En aspectos adicionales, el sujeto padece aterosclerosis.

También se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la lesión por reperfusión o una afección asociada con la lesión por reperfusión. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece una lesión por reperfusión. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 está en riesgo de desarrollar una lesión por reperfusión. En algunos aspectos, el sujeto se va a someter a una cirugía. En otros aspectos, el sujeto se ha sometido a una cirugía. En algunos aspectos, la cirugía es un trasplante o una cirugía de derivación coronaria. En aspectos adicionales, el paciente padece o está en riesgo de desarrollar un infarto de miocardio con una lesión por reperfusión. En aspectos adicionales, el método disminuye la lesión de miocardio, disminuye la acumulación de colágeno, reduce la CK-MB y MDA séricos, reduce el tamaño de los cardiomiocitos, reduce la infiltración de leucocitos y/o reduce la disfunción cardíaca (por ejemplo, reducción de LVP e incremento de LVEDP). En aspectos adicionales, el método aumenta el volumen de eyección, el acortamiento fraccional y/o la fracción de inyección del corazón.

En la divulgación también se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la reestenosis o una afección asociada con la reestenosis. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece reestenosis. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 está en riesgo de desarrollar reestenosis. En algunos aspectos, el sujeto se va a someter a una cirugía. En otros aspectos, el sujeto se ha sometido a una cirugía. En algunos aspectos, la cirugía es un procedimiento endovascular. En realizaciones adicionales, la cirugía es cirugía vascular, cirugía cardíaca o angioplastia. En aspectos adicionales el procedimiento es un trasplante o una cirugía de derivación coronaria. En aspectos adicionales la reestenosis tratada, prevenida y/o mejorada es una reestenosis de la endoprótesis o una reestenosis posangioplástica.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la enfermedad vascular periférica (PVD) o una afección asociada con la PVD. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece PVD. En otros aspectos, el sujeto al que se le administra la proteína de unión a LOX1 está en riesgo de desarrollar la PVD. En algunos aspectos, el sujeto presenta una cantidad sérica elevada de sLOX1 o una actividad de LOX1 elevada. En aspectos adicionales, el sujeto padece aterosclerosis.

En la divulgación también se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la inflamación o una afección

asociada con la inflamación. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece inflamación. En algunos casos, el sujeto padece inflamación crónica. En algunos aspectos, el sujeto presenta una cantidad sérica elevada de oxLDL y/o sLOX1 y/o una actividad de LOX1 elevada. En aspectos adicionales, el sujeto padece aterosclerosis.

En la divulgación también se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la preeclampsia o una afección asociada con la preeclampsia. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este en una composición farmacéutica descrita en la presente) a un sujeto que padece preeclampsia o eclampsia. En aspectos adicionales, el sujeto padece hipertensión arterial y una cantidad elevada de proteínas en la orina. En algunos aspectos, el sujeto presenta una cantidad sérica elevada de oxLDL y/o sLOX1 y/o una actividad de LOX1 elevada. En aspectos adicionales, el sujeto presenta hinchazón en los pies, piernas y/o manos.

En aspectos adicionales, en la divulgación se proporcionan métodos para estabilizar una placa aterosclerótica en un sujeto. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) a un sujeto que lo necesite. En algunos aspectos, el método reduce la ruta de transducción de señales por RhoA/Rac1, monóxido de

nitrógeno, p38MAPK, proteína-quinasas B y C, ERK1/2 y/o NF κ B en la placa. En otros aspectos, el método disminuye la apoptosis en la placa. En aspectos adicionales, el método disminuye la actividad de la caspasa 8, caspasa 9 y/o BAX y/o aumenta la actividad de BCL-2 en la placa. En otros aspectos, el método disminuye la cantidad de una molécula de adhesión o citocina producida por la placa. En aspectos adicionales, el método disminuye la expresión de E-selectina, P-selectina, ICAM-1, VCAM-1, MCP1 y/o CD40/CD40L por parte de la placa. En aspectos adicionales, el método disminuye el tamaño o la formación de la placa aterosclerótica, la acumulación de macrófagos y/o la expresión de MMP (por ejemplo, MMP9) en la placa aterosclerótica. En aspectos adicionales, el método da como resultado una disminución de la evolución o una regresión de la placa.

También se proporcionan métodos para reducir la pérdida de tono vascular en un sujeto. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) a un sujeto que lo necesite. En algunos aspectos, el método reduce la pérdida de tono vascular. En aspectos adicionales, el método reduce la pérdida de tono vascular en un sujeto regulando la producción de óxido nítrico (NO) impulsada por HDL (capacidad del anticuerpo de estimular la producción de NO endotelial).

De forma adicional, se proporcionan métodos para mejorar el tono vascular en un sujeto. En algunos casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1

(por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) a un sujeto que lo necesite.

En algunos aspectos, en la divulgación se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar una afección asociada con la hiperglucemia o hipertensión. En algunos
5 casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 a un sujeto que padece hiperglucemia o hipertensión.

De manera adicional, se proporcionan métodos para tratar, prevenir y/o mejorar el cáncer. En algunos casos, en
10 la divulgación se proporciona un método para tratar, prevenir y/o mejorar el cáncer en un sujeto que comprende administrar una proteína de unión a LOX1 a un sujeto que padece cáncer. En algunos aspectos, el sujeto padece un cáncer seleccionado a partir del grupo constituido por: cáncer de mama, cáncer
15 de colon, cáncer ovárico, melanoma, cáncer cervicouterino, cáncer de pulmón, cáncer uterino, cáncer renal y cáncer pancreático.

También se proporcionan métodos para inhibir la proliferación o migración de las células tumorales, o la
20 invasión por parte de estas. En algunos casos, en la divulgación se proporciona un método para antagonizar la actividad de LOX1 que comprende poner en contacto una proteína de unión a LOX1 con una célula tumoral que expresa LOX1. En algunos aspectos, la célula tumoral procede de un
25 cáncer seleccionado a partir del grupo constituido por: cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer ovárico, melanoma, cáncer cervicouterino, cáncer de pulmón, cáncer uterino, cáncer renal y cáncer pancreático. En algunos aspectos, la célula tumoral procede de una línea cancerosa.

30 En la divulgación se proporcionan de manera adicional métodos para reducir o inhibir la angiogénesis. En algunos

aspectos, el método para reducir o inhibir la angiogénesis comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) a un sujeto que lo necesite. En algunos aspectos, el sujeto
5 padece una afección asociada con una angiogénesis patológica. En aspectos adicionales, en la divulgación se proporciona un método para inhibir la angiogénesis que comprende poner en contacto una proteína de unión a LOX1 con una célula que expresa LOX1. En algunos aspectos, la célula
10 es una célula endotelial. En aspectos adicionales, la célula endotelial es una célula endotelial coronaria. En algunos aspectos, el método se realiza *in vitro*. En otros aspectos, el método se realiza *in vivo*.

De manera adicional, se proporcionan métodos para
15 bloquear o reducir la actividad de LOX1. En algunos aspectos, en la divulgación se proporcionan métodos para bloquear la actividad de LOX1 que comprenden administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de éste) que reduce o inhibe la interacción entre
20 LOX1 y ligando de LOX1 tal como oxLDL, AGE y/o CRP. En algunos aspectos, se expresa LOX1 en la superficie de una célula endotelial, macrófago, célula vascular del músculo liso y/o trombocito. En algunos aspectos, la célula es una célula endotelial tal como una célula endotelial coronaria.
25 En aspectos adicionales, la célula es una célula del músculo liso vascular, macrófago o trombocito. En otros aspectos, la célula es parte de un tejido aterosclerótico. En algunos aspectos, el método se realiza *in vivo*. En otros aspectos, el método se realiza *in vitro*. En algunos aspectos, la
30 actividad de LOX1 bloqueada o reducida es la unión a oxLDL y/o la captación (por ejemplo, internalización) de esta. En

aspectos adicionales, la actividad de LOX1 bloqueada o reducida es la inducción de p38 (MAPK), p44/42 MAPK, proteína-cinasa C (PKC), proteína-cinasa B (PKB), proteína tirosina-cinasa (PTK), factor de transcripción NF-KB y/o
5 ruta de señalización de AP1. En aspectos adicionales, la actividad de LOX1 bloqueada o reducida es la inducción de la apoptosis. En realizaciones adicionales, la inducción de la apoptosis está mediada por la caspasa-9, caspasa-3 y/o Bcl-2. En aspectos adicionales, la actividad de LOX1 bloqueada
10 o reducida es la expresión de las cadenas A y B de PDFG y/o la proteína similar a EGF de unión a la heparina (HB-EGF) en las células endoteliales que expresan LOX1. En algunos aspectos, la actividad de LOX1 bloqueada o reducida es una actividad de LOX1 inducida por la unión de oxLDL a LOX1.

15 De manera adicional, se proporcionan métodos para bloquear o reducir la actividad de LOX1 en una afección patológica asociada con un aumento de los niveles de actividad de LOX1 o los niveles de expresión de LOX1 (por ejemplo, cantidad de proteína sérica sLOX1). En algunos
20 casos, el método comprende administrar una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) a un sujeto que presenta un aumento de la actividad de LOX1 o de los niveles de expresión de LOX1 (por ejemplo, cantidad de proteína sérica sLOX1). En algunos aspectos, la
25 afección patológica es lupus sistémico eritematoso (SLE), diabetes, hipertensión, hiperglucemia, insuficiencia cardíaca, lesión vascular, trasplante, dislipidemia (hiperlipidemia), inflamación (por ejemplo, inflamación crónica e inflamación inducida por endotoxinas) o infección
30 bacteriana. En algunos aspectos, el sujeto presenta niveles elevados de oxLDL. En algunos aspectos, el sujeto presenta

una elevación de la cantidad sérica de oxLDL, LDL modificada por la 15-lipoxigenasa, HDL modificada por la 15-lipoxigenasa, LDL glioxidada, lisofosfatidilcolinesterasa (LPC) y/o ácido palmítico. En aspectos adicionales, el sujeto
5 presenta una cantidad sérica elevada de TNF α , IL1, interferón γ , LPS (lipopolisacárido), CRP, angiotensina II, endotelina I y/o AGE. En aspectos adicionales, el sujeto presenta una cantidad sérica elevada de LOX1 soluble (sLOX1). En algunos aspectos, el sujeto presenta un polimorfismo
10 mononucleotídico (SNP) en el gen LOX1. En algunos aspectos, el SNP en el gen LOX1 es una variante K167N de LOX1.

También se proporcionan métodos para agonizar o aumentar una actividad de la lipoproteína de alta densidad (HDL). En algunos aspectos, en la divulgación se proporciona
15 un método para aumentar o agonizar una actividad de la HDL administrando una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 o un fragmento de este) a un sujeto que lo necesite. En algunos aspectos, la actividad de HDL aumentada es la estimulación de la producción de NO
20 endotelial mediada por HDL. En algunos aspectos, la actividad de HDL aumentada es la inhibición de la actividad de señalización de NF κ B de la célula endotelial. En algunos aspectos, la actividad de HDL aumentada es la estimulación de la reparación celular endotelial. En algunos aspectos, la
25 actividad de HDL aumentada es la reducción de la inflamación.

También se proporciona el uso de una proteína de unión a LOX1 tal como una proteína de unión a LOX1 proporcionada en la presente para la monitorización diagnóstica de la
30 cantidad de proteína (por ejemplo, cantidad de LOX1) en la sangre o tejido o como parte de un procedimiento de estudio clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de una

pauta posológica dada. Por ejemplo, se puede facilitar la detección acoplando una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1) a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen

5 diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen la peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa;

10 los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen la nptadivina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen la umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material

15 luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen la luciferasa, luciferina y aecuorina; y los ejemplos de un material radiactivo adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

20 **VIII. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración**

Los métodos para preparar y administrar una proteína de unión a LOX1 proporcionada en la presente a un sujeto que la necesite son conocidos o los expertos en la técnica los

25 podrán determinar fácilmente. La vía de administración de una proteína de unión a LOX1 puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término "parenteral", tal como se utiliza en la presente, incluye, por ejemplo, la administración intravenosa, intraarterial,

30 intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Aunque se contempla claramente que todas estas

formas de administración se encuentran dentro del alcance de la divulgación, otro ejemplo de una forma de administración sería una solución para inyección, en particular para el goteo o la inyección intraarterial o intravenosa.

5 Normalmente, una composición farmacéutica adecuada puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), de manera opcional un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina humana), etc. En otros métodos compatibles con el
10 contenido de la presente, se pueden suministrar proteínas de unión a LOX1 como las proporcionadas en la presente directamente al órgano y/o sitio de una aterosclerosis o tumor, para incrementar de esta manera la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico. En un aspecto, se
15 administra directamente a la vía respiratoria, por ejemplo, por inhalación o administración intranasal.

Tal como se analiza en la presente, las proteínas de unión a LOX1 se pueden administrar en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de
20 enfermedades y afecciones mediadas por LOX1 tales como la aterosclerosis, trombosis, CAD, isquemia (por ejemplo, isquemia de miocardio), infarto (por ejemplo, infarto de miocardio), síndrome coronario agudo (ACS), accidente cerebrovascular, lesión por reperfusión, reestenosis,
25 enfermedad vascular periférica, hipertensión, insuficiencia cardíaca, inflamación (por ejemplo, inflamación crónica), angiogénesis, preeclampsia y cáncer. En este sentido, se comprenderá que las proteínas de unión a LOX1 divulgadas se pueden formular de manera que se facilite la administración
30 y se favorezca la estabilidad del agente activo. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la divulgación

pueden comprender un portador farmacéuticamente aceptable, atóxico y estéril tal como solución salina fisiológica, tampones atóxicos, conservantes y similares. A los efectos de la presente solicitud, una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína de unión a LOX1, conjugada o no conjugada, se refiere a una cantidad suficiente para lograr una unión eficaz a LOX1 y para lograr un beneficio, por ejemplo, para mejorar los síntomas de una enfermedad o afección o para detectar una sustancia o una célula. Se describen formulaciones adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos divulgados en la presente, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16.^a ed. (1980).

Ciertas composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente se pueden administrar por vía oral en una forma farmacéutica aceptable que incluye, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. Ciertas composiciones farmacéuticas también se pueden administrar mediante inhalación o aerosol nasal. Tales composiciones se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

La cantidad de una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) que se puede combinar con materiales portadores para producir una forma farmacéutica única variará dependiendo del sujeto tratado y el modo de administración concreto. La composición se puede

administrar como una única dosis, múltiples dosis o a lo largo de un periodo de tiempo establecido en una venoclisis. Las pautas posológicas también se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una
5 respuesta terapéutica o profiláctica).

De conformidad con el alcance de la presente divulgación, se puede administrar una proteína de unión a LOX1 a un sujeto humano o de otro tipo de acuerdo con los métodos de tratamiento mencionados anteriormente en una
10 cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico. Las proteínas de unión a LOX1 proporcionadas en la presente se pueden administrar a tal ser humano o animal diferente en una forma farmacéutica tradicional preparada combinando las proteínas de unión a LOX1 con un portador o diluyente
15 farmacéuticamente aceptable de acuerdo con técnicas conocidas. La forma y carácter del portador o diluyente farmacéuticamente aceptable pueden estar dictados por la cantidad de principio activo con el que se va a combinar, la vía de administración y otras variables muy conocidas.
20 También se puede utilizar un cóctel que comprenda una o más proteínas de unión a LOX1 diferentes.

La expresión "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal
25 como un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) que cuando se administra conlleva una respuesta terapéutica positiva respecto al tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad o afección que se va a tratar.

30 Las dosis terapéuticamente eficaces de composiciones con la proteína de unión a LOX1 para el tratamiento de

enfermedades o afecciones mediadas por LOX1 tales como la aterosclerosis, trombosis, CAD, isquemia (por ejemplo, la isquemia de miocardio), infarto (por ejemplo, infarto de miocardio), síndrome coronario agudo (ACS), accidente
5 cerebrovascular, lesión por reperfusión, reestenosis, enfermedad vascular periférica, hipertensión, insuficiencia cardíaca, inflamación (por ejemplo, inflamación crónica), angiogénesis, preeclampsia y cáncer, varían dependiendo de muchos factores, que incluyen el medio de administración,
10 sitio diana, estado fisiológico del sujeto, si el sujeto es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el sujeto es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos incluidos mamíferos
15 transgénicos. Se pueden titular las dosificaciones de tratamiento utilizando métodos habituales conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y eficacia.

La expresión "mejorar los síntomas de una enfermedad o
20 afección concreta administrando una proteína de unión a LOX1", tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier disminución, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria que se pueda atribuir o asociar con la administración de la proteína de unión a LOX1.

25 Con esta divulgación, el experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de al menos una proteína de unión a LOX1, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión, que se va a administrar sin una experimentación excesiva. Los factores que influyen en el modo de
30 administración y la cantidad respectiva de al menos una molécula de unión a LOX1 incluyen, por ejemplo, sin carácter

limitante, la gravedad de la enfermedad, los antecedentes de la enfermedad, y la edad, talla, peso, salud y estado físico del individuo que se somete a terapia. De manera similar, la cantidad de la proteína de unión a LOX1 que se va a administrar dependerá del modo de administración y de si el sujeto recibirá una dosis única o múltiples dosis de este agente.

En la divulgación también se proporciona el uso de una proteína de unión a LOX1, tal como un anticuerpo contra LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) en la producción de un medicamento, por ejemplo, para mejorar la actividad de HDL, y los métodos para tratar, prevenir y/o mejorar la aterosclerosis, trombosis, CAD, isquemia (por ejemplo, isquemia de miocardio), infarto (por ejemplo, infarto de miocardio), síndrome coronario agudo (ACS), accidente cerebrovascular, lesión por reperfusión, reestenosis, enfermedad vascular periférica, inflamación (por ejemplo, inflamación crónica), angiogénesis, preeclampsia y cáncer.

Terapias combinadas

En algunos aspectos, una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) se administra combinada con una o más terapias diferentes. Tales terapias incluyen agentes terapéuticos adicionales así como también otras intervenciones médicas. Los agentes terapéuticos a modo de ejemplo que se pueden administrar combinados con las proteínas de unión a LOX1 proporcionadas en la presente incluyen, sin carácter limitante, inhibidores trombocíticos,

anticoagulantes, antihipertensivos, inhibidores del receptor IIb/IIIa de glucoproteínas, β -bloqueadores, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de las HMG-CoA-reductasas (estatinas), ezetimiba, fibratos (por ejemplo, Gemifribrozil y Fenofibrato), Zetia, secuestradores del ácido biliar, nitratos y agentes trombolíticos.

En varios aspectos, se administra una proteína de unión a LOX1 a un sujeto antes, durante y/o después de un procedimiento quirúrgico. En algunos aspectos, la cirugía es un procedimiento endovascular. En realizaciones adicionales, la cirugía es cirugía vascular, cirugía cardíaca o angioplastia. En aspectos adicionales el procedimiento es un trasplante o una cirugía de derivación coronaria.

IX. Diagnóstico

Esta divulgación proporciona además un método diagnóstico útil durante el diagnóstico de enfermedades y afecciones mediadas por LOX1 tales como aterosclerosis, trombosis, arteriopatía coronaria (CAD), isquemia (por ejemplo, isquemia del miocardio), infarto (por ejemplo, infarto de miocardio), síndrome coronario agudo (ACS), accidente cerebrovascular, lesión por reperfusión, reestenosis, enfermedad vascular periférica, hipertensión, insuficiencia cardíaca, inflamación, angiogénesis, preeclampsia y cáncer, que conlleva medir el nivel de expresión de la proteína LOX1 (incluido sLOX1) en el tejido o fluido corporal tal como el suero de un individuo y comparar el nivel de expresión medido con un nivel de expresión de LOX1 estándar en un tejido o fluido corporal normal, conforme al cual un aumento en el nivel de expresión comparado con el estándar es indicativo de un trastorno que se puede tratar con una proteína de unión a LOX1

proporcionada en la presente, tal como un anticuerpo contra LOX1 completo y un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo tal como se proporciona en la presente.

Las proteínas de unión a LOX1 proporcionadas en la presente tales como anticuerpos contra LOX1 (por ejemplo, anticuerpos contra LOX1 completos y fragmentos de unión a LOX1 anticuerpos, y variantes y derivados de estos) se pueden utilizar para someter a ensayo la cantidad de proteína LOX1 en una muestra biológica utilizando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos por los expertos en la técnica (remítase, por ejemplo, a Jalkanen, *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen *et al.*, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos con anticuerpos útiles para detectar la expresión de la proteína LOX1 incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), inmunoprecipitación o inmunoelectrotransferencia.

La expresión "someter a ensayo el nivel de expresión de la proteína LOX1" se pretende que haga referencia a la medición o estimación de manera cualitativa o cuantitativa de la cantidad de proteína LOX1 en una primera muestra biológica ya sea de manera directa (por ejemplo, determinando o estimando la cantidad de proteína absoluta) o de manera relativa (por ejemplo, comparando con la cantidad de polipéptido asociado a la enfermedad en una segunda muestra biológica). El nivel de expresión de la proteína LOX1 en una primera muestra biológica se puede medir o estimar y comparar con la cantidad de proteína LOX1 estándar, donde el valor estándar se toma de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no padece el trastorno o se determina promediando la cantidad en una población de individuos que

no padecen el trastorno. Tal como se sobreentenderá en la técnica, una vez que se conoce la cantidad de proteína LOX1 "estándar", ésta se puede utilizar de manera repetida como valor estándar para la comparación.

5 La expresión "muestra biológica" se pretende que haga referencia a cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, línea celular, cultivo tisular u otra fuente de células que expresan potencialmente LOX1. En la técnica existe constancia de métodos para obtener biopsias tisulares
10 y fluidos corporales de mamíferos.

X. Kits que comprenden proteínas de unión a LOX1

 Esta divulgación proporciona además kits que incluyen una proteína de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, un
15 fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) en un envase adecuado y con material escrito y que se puede utilizar para realizar los métodos escritos en la presente.

 El material escrito puede incluir cualquiera de los
20 siguientes tipos de información: instrucciones para su uso, análisis de los estudios clínicos, enumeración de efectos secundarios, referencias de la bibliografía científica, prospecto del envase, resultados de los ensayos clínicos y/o resúmenes de estos y similares. El material escrito puede
25 indicar o establecer las actividades y/o ventajas de la composición y/o describir la dosificación, administración, efectos secundarios, interacciones del fármaco u otra información útil al profesional sanitario. Tal información puede basarse en los resultados de diversos estudios, por
30 ejemplo, estudios que utilizan animales de experimentación que conllevan modelos *in vivo* y/o estudios basados en ensayos

clínicos con seres humanos. El kit puede contener además otra terapia (por ejemplo, otro agente) y/o material escrito tal como el descrito anteriormente cuya función es proporcionar información respecto a la otra terapia (por ejemplo, el otro agente).

En ciertos aspectos, un kit comprende al menos una proteína de unión a LOX1 purificada en uno o más recipientes. En algunos aspectos, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo de detección, incluidos todos los controles, instrucciones para realizar los ensayos y cualquier software necesario para el análisis y la presentación de los resultados.

XI. Inmunoensayos

Las proteínas de unión a LOX1 (por ejemplo, anticuerpos contra LOX1 y fragmentos de unión a LOX1, variantes o derivados de estos) se pueden someter a ensayo para determinar la unión inmuno-específica mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que se pueden utilizar incluyen, sin carácter limitante, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como inmuno-electrotransferencias, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmuno-adsorción enzimática), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con la proteína A, por nombrar unos pocos. Tales ensayos son habituales y conocidos en la técnica (remítase a, p. ej., Ausubel *et al.*, eds, (1994) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons,

Inc., NY) Vol. 1, que se incorpora a modo de referencia a la presente en su totalidad).

Las proteínas de unión a LOX1 (por ejemplo, anticuerpos contra LOX1 o fragmentos de unión a LOX1, variantes o derivados de estos) que se proporcionan en la presente se pueden emplear de manera histológica, como en la inmunofluorescencia, microscopía inmunoelectrónica o ensayos no inmunológicos, para la detección *in situ* de LOX1 o variantes conservadas o fragmentos peptídicos de este. La detección *in situ* se puede lograr extrayendo una muestra histológica de un sujeto y aplicando a esta proteínas de unión a LOX1 marcadas superponiendo las proteínas de unión a LOX1 marcadas a la muestra biológica. Mediante el uso de un procedimiento este tipo, es posible determinar no solamente la presencia de LOX1, o variantes conservadas o fragmentos peptídicos, sino también su distribución en el tejido examinado. Utilizando la presente divulgación, los expertos en la técnica comprenderán fácilmente que se puede modificar un método cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como los procedimientos de tinción) con el fin de conseguir tal detección *in situ*.

La actividad de unión de un conjunto concreto de proteínas de unión a LOX1 (por ejemplo, un anticuerpo contra LOX1 tal como un anticuerpo contra LOX1 completo, y un fragmento de unión a LOX1 de un anticuerpo, y variantes y derivados de estos) se puede determinar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar las condiciones operativas y de ensayo óptimas para cada determinación empleando la experimentación habitual.

En la técnica existe constancia de métodos y reactivos adecuados para la determinación de las características de unión de una proteína de unión a LOX1 aislada y/o están comercializados. El equipo y el software diseñado para tales análisis cinéticos están comercializados (por ejemplo, software BIAevaluation®, BIAcore®, GE Healthcare; software KINEXA®, Sapidyne Instruments).

A menos que se indique lo contrario, en la puesta en práctica de la divulgación se emplean técnicas tradicionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN combínante e inmunología, que están comprendidas en las competencias de la técnica. Tales técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Remítase, por ejemplo, a Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2.^a ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* patente de EE. UU. N.º 4 683 195; Hames y Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames y Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller y Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 y 155; Mayer y Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir y Blackwell, eds., (1986)

Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y Ausubel *et al.* (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Los principios generales de manipulación de anticuerpos se exponen en Borrebaeck, ed. (1995) Antibody Engineering (2.^a ed.; Oxford Univ. Press). Los principios generales de modificación de proteínas se exponen en Rickwood *et al.*, eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press en Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Los principios generales de anticuerpos y unión de anticuerpo-hapteno se exponen en: Nisonoff (1984) Molecular Immunology (2.^a ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); y Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman and Hall, New York, N.Y.). Adicionalmente, se siguen por lo general los métodos estándar en inmunología conocidos en la técnica y no descritos de manera específica como en Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York; Stites *et al.*, eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8.^a ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) y Mishell *et al* (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman & Co., NY).

Los trabajos de referencia habituales que exponen los principios generales de inmunología incluyen Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett *et al.*, eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyzes (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" en Laboratory Techniques in

Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden *et al.*, (Elsevier, Amsterdam); Goldsby *et al.*, eds. (2000) Kuby Immunology (4.^a ed.; H. Freeman & Co.); Roitt *et al.* (2001) Immunology (6.^a ed.; Londres: Mosby); Abbas *et al.* (2005) Cellular and Molecular Immunology (5.^a ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann y Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach *et al.*, (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press).

Los siguientes ejemplos se presentan a modo de ilustración y no a modo de limitación.

15 EJEMPLOS

Se pueden definir de manera adicional aspectos de la presente divulgación en referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que describen en detalle la preparación de ciertos anticuerpos de la presente divulgación y métodos para utilizar los anticuerpos de la presente divulgación. Resultará evidente para los expertos en la técnica que se pueden poner en práctica muchas modificaciones, tanto en los materiales como en los métodos, sin apartarse del alcance de la presente divulgación.

25 **Ejemplo 1. Aislamiento e identificación de los anticuerpos scFv contra LOX1**

Se utilizó una colección grande de anticuerpos humanos Fv monocatenarios (scFv) obtenidos a partir de la médula ósea de donantes no expuestos al antígeno adultos y clonados en un vector de fagómido basado en el fago filamentoso M13 para las selecciones (Hutchings, C., Generation of Naïve

Human Antibody Libraries, en Antibody Engineering, R. Kontermann y S. Dubel, Editores. 2001, Springer Laboratory Manuals, Berlin. pág. 93). Se aislaron anticuerpos scFv específicos contra LOX1 a partir de la colección de presentación en fagos en una serie de ciclos de selección repetidos en LOX1 humano recombinante expresado en mamíferos (R&D Systems) esencialmente tal como se ha descrito previamente (Vaughan *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 14:309 (1996)). Aunque se obtuvieron varios scFv específicos para el antígeno a partir de variaciones diferentes de este protocolo, los clones originales LOX514 (SEQ ID NO:29 (VH) y la SEQ ID NO:33 (VL); también denominado en la presente "LOX10514") y LOX696 (la SEQ ID NO:54 (VH) y la SEQ ID NO:70 (VL); también denominado en la presente "LOX10696") se aislaron de la siguiente manera: se inmovilizaron 10 µg/mL de LOX1 humano en placas MAXISORP™ (Nunc) y se incubaron con la colección de presentación en fagos. Se eliminaron los fagos no unidos con lavados en una serie de ciclos de lavado. Se eluyeron las partículas de fago retenidas sobre el antígeno, se utilizaron para infectar bacterias y se recuperaron para la siguiente ronda de selección. Se llevaron a cabo tres rondas de selección de esta manera. Se cultivó en placas de 96 pocillos un número representativo de clones individuales procedentes de los resultados de la selección de la ronda 2 y la ronda 3. Se expresaron scFv en el periplasma bacteriano y se cribaron según su actividad inhibidora en un ensayo de unión LOX1:oxLDL tal como se describe en el Ejemplo 10, Ensayo 1.

Los resultados positivos del cribado, es decir, los clones de scFv que mostraron un efecto inhibidor en la interacción LOX1:oxLDL, como extractos periplasmáticos

crudos, se sometieron a secuenciación de ADN (Vaughan *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 14:309 (1996), y Osbourn *et al.*, *Immunotechnology* 2:181 (1996)). Se reexpresaron scFv únicos en bacterias y se purificaron mediante cromatografía de
5 afinidad (tal como se describe en el Ejemplo 3 de la publicación de solicitud internacional N.º W001/66754), y se determinaron los valores de IC₅₀ estudiando series de diluciones de scFv purificados en el ensayo anterior.

Los clones de scFv más potentes se convirtieron en un
10 formato de anticuerpo triple mutante de inmunoglobulina G1 completa (IgG1-TM, secuencia Fc de la IgG1 humana que incorpora las mutaciones L234F, L235E y P331S) esencialmente tal como se describe en Persic *et al.*, *Gene* 187:9 (1997) con las siguientes modificaciones. Se incluyó un fragmento de
15 OriP en los vectores de expresión para facilitar el uso con células CHO y para permitir la replicación episomal. Se clonó el dominio VH en un vector que contenía los dominios constantes de la cadena pesada humana y elementos reguladores para expresar la cadena pesada de (IgG1 completa)-TM en
20 células de mamíferos. De manera similar, se clonó el dominio VL en un vector para la expresión de los dominios constantes de cadena ligera humana y elementos reguladores para expresar la cadena ligera de la IgG completa en células de mamíferos. Para obtener las IgG, se utilizaron los vectores que expresan
25 IgG de cadena pesada y ligera para transfectar células CHO de mamíferos. Se expresaron las IgG y se secretaron al medio. Se agruparon las recolecciones, se filtraron y la IgG se purificó utilizando cromatografía con la Proteína A. Se añadieron los sobrenadantes del cultivo a una columna del
30 tamaño adecuado con proteína A cerámica (BioSeptra) y se lavaron con Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 y NaCl 250 mM. Se eluyó

la IgG unida de la columna utilizando citrato de sodio 0.1 M (pH 3.0) y se neutralizó mediante la adición de Tris-HCl (pH 9.0). El material eluido se sometió a un intercambio del tampón con PBS utilizando columnas Nap10 (Amersham, n.º 17-0854-02) y se determinó espectrofotométricamente la concentración de la IgG utilizando un coeficiente de extinción basado en la secuencia de aminoácidos de la IgG (Mach *et al.*, *Anal Biochem*, 200:74 (1992)). Se analizaron las IgG purificadas para determinar la agregación y degradación utilizando SEC-HPLC y por SDS-PAGE.

EJEMPLO 2 - Anticuerpos contra LOX1 que inhiben la unión multiligando, internalización de oxLDL y la señalización inducida por oxLDL

Se estudiaron las IgG purificadas para determinar su capacidad de inhibir de manera específica la unión de las lipoproteínas de baja densidad oxidadas ("oxLDL"), productos finales de glucación avanzada de la albúmina de suero bovino ("AGE-BSA") y la proteína C-reactiva ("CRP") a LOX1 tal como se describe en el Ejemplo 10, Ensayos 1, 2 y 3. Se estudiaron varios clones aislados incluidos LOX10514 y LOX10696, y el anticuerpo contra LOX1 de ratón comercializado (23C11) para determinar su capacidad de bloquear la unión de oxLDL, AGE-BSA y CRP a LOX1. Se muestran gráficos representativos en las Figuras 1A, 1B y 1C donde se muestra la inhibición de la unión de oxLDL, AGE-BSA y CRP, respectivamente, por parte de LOX514 y LOX696. Para confirmar que los anticuerpos reaccionan de manera cruzada y que tienen una actividad funcional en SNP K167N de LOX1, se estudiaron los anticuerpos para determinar su capacidad de bloquear la unión de oxLDL a SNP K167N de LOX1. SNP K167N de LOX1 (N.º de acceso GenBank AB102861) es una variante de LOX1 humano de origen natural

descubierta inicialmente en una familia de pacientes con cardiopatía isquémica y que se cree que está asociada con un mayor riesgo de infarto de miocardio. Remítase a, por ejemplo, Tatsuguchi *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 28;303(1):247-50 (2003). En la Figura 1D se muestran los gráficos representativos donde se muestra que tanto LOX514 como LOX696 bloquean la unión de oxLDL a la variante SNP K167N de LOX1. Además de la inhibición de la unión, se estudiaron varios clones aislados que incluían LOX10514 y LOX10696 para determinar su capacidad de bloquear la internalización de oxLDL en células que expresan LOX1 (tal como se describe en el Ejemplo 10, Ensayo 4) y la señalización de LOX1 inducida por oxLDL (tal como se describe en el Ejemplo 10, Ensayo 5). En las Figuras 2A y 2B se muestran los gráficos representativos de la inhibición de la internalización y la señalización de oxLDL, respectivamente. Los resultados de estos estudios se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Inhibición de la internalización de oxLDL

	LOX10696	23C11	LOX10514
Media	1.31E-10	2.20E-09	6.42E-10
DE	1.14E-10	6.49E-10	8.54E-11
n	8	5	4
Media	2.46E-10	1.31E-09	7.03E-10
DE	1.11E-10		2.82E-10
n	2	1	3
Media	3.50E-10	2.85E-09	7.72E-10
DE	7.68E-11	8.38E-10	1.11E-10
n	2	3	3
Media	8.73E-11	1.15E-09	2.07E-10
DE	8.23E-11	1.07E-09	1.61E-10
n	2	2	3
Media	4.69E-09	1.11E-08	1.98E-09
DE	4.02E-09	9.62E-10	7.31E-10
n	2	2	2
Media	6.22E-09	1.01E-08	8.28E-09
DE	2.13E-09		2.84E-09
n	6	1	8

Con estos resultados se demuestra: (1) la inhibición específica, de la unión de oxLDL, AGE-BSA y CRP a LOX1 por parte de los anticuerpos LOX514 y LOX696; (2) que tanto LOX514 como LOX696 reaccionan de manera cruzada desde un punto de vista funcional con la variante SNP K167N de LOX1 común; (3) LOX514 y LOX696 inhiben la internalización de oxLDL; y (4) LOX514 y LOX696 inhiben la señalización de LOX-1 inducida por oxLDL.

EJEMPLO 3 - Reactividad cruzada entre especies de anticuerpos contra LOX1 y especificidad por LOX1 humano en un conjunto de miembros de una familia humana

Se evaluó la reactividad cruzada de los anticuerpos contra LOX1 humano respecto a ortólogos de LOX1 de varias especies mediante un ELISA de unión a scFv. Se diseñaron los constructos del dominio extracelular para LOX1 humano (Uniprot: P78380), de ratón (Uniprot: Q9EQ09), de rata (Uniprot: 070156), de conejo (Uniprot: Q9XTA8) y mono cinomolgo con etiquetas Flag N- o C-terminal y de histidina y se clonaron en vectores de destino Gateway (Invitrogen). A continuación, se transfirieron los constructos a células HEK293 EBNA de mamíferos para la expresión proteica. A continuación, se sometieron las proteínas a una purificación por cromatografía de exclusión por tamaño y afinidad estándar. Resumiendo, se utilizaron 10, 10, 5, 5 y 5 µg/mL de (HisFlag)-(LOX1 humano), (LOX1 de cinomolgo)-(FlagHis), (LOX1 de ratón)-(FlagHis), (LOX1 de rata)-(FlagHis) y (LOX1 de conejo)-(FlagHis), respectivamente, en tampón PBS, para recubrir placas MAXISORP™. En primer lugar, se comprobó la eficacia del recubrimiento con el antígeno utilizando tales concentraciones mediante ELISA utilizando anticuerpos contra LOX1 humano comercial (23C11 de Hycult) o contra His (marcado

con Europio de Perkin Elmer). Después de bloquear los pocillos con PBS que contenía un 3% de leche en polvo, se incubaron scFv contra LOX1 en PBS con un 3% de leche desnatada con los diferentes recubrimientos de antígenos durante una hora. Se detectaron las moléculas de scFv unido utilizando 100 ng/mL de un anticuerpo secundario marcado con Europio contra la etiqueta Myc (Perkin Elmer). Las placas se leyeron para detectar la fluorescencia utilizando una excitación a 340 nm y emisión a 615 nm. Se determinó la unión no específica en albúmina de suero bovino (New England Biolabs) con un recubrimiento con 10 µg/mL.

Tal como se muestra en la Figura 3A, LOX514 ("LOX10514") y LOX696 ("LOX10696") se unen a LOX1 humano y de cinomolgo, pero no a los ortólogos de LOX1 de ratón, rata o conejo. La ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con el LOX1 de ratón no es sorprendente dada la baja homología en el dominio de lectina de tipo C entre estas especies (~62% de identidad entre el ser humano y el ratón).

Se evaluó la especificidad de las moléculas del anticuerpo contra LOX1 humano por otras moléculas relacionadas con el receptor depurador y de lectina de tipo C humana mediante un ELISA de unión a IgG tal como se describe en el Ejemplo 10, Ensayo 6. Tal como se muestra en la Figura 3B, LOX514 ("LOX10514") y LOX696 ("LOX10696") se unen únicamente a LOX1 humano y no se unen a CLEC-7A, CLEC-1A, CLEC-4L, CLEC-1B, SR-A1 y SR-B3 humanos. Con este resultado se demuestra la especificidad de LOX514 y LOX696 por LOX1.

EJEMPLO 4 - Aislamiento e identificación de anticuerpos scFv contra LOX1 con una potencia optimizada mediante aleatorización dirigida de CDR y recombinación de LOX514

Se optimizó LOX514 utilizando selecciones de fagos en función de la afinidad. Se crearon colecciones grandes de scFv obtenidos a partir de la secuencia scFv de LOX514 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos de las regiones determinantes de la complementariedad 2 o 3 de la cadena pesada variable (VH) (CDR2-VH o CDR3-VH) o las regiones 3 determinantes de la complementariedad de la cadena ligera variable (VL) (CDR3-VL) utilizando técnicas habituales de biología molecular como se ha descrito (Clackson, T. y Lowman, H.B. *Phage Display - A Practical Approach*, 2004. Oxford University Press). Las colecciones se sometieron a selecciones de presentación en fagos en función de la afinidad con el fin de seleccionar las variantes con una afinidad más elevada por LOX1 humano. Se esperaba que estas mostraran una mejor actividad inhibidora de la unión a LOX1 de oxLDL y los otros ligandos de LOX1. Las selecciones se realizaron esencialmente como se ha descrito previamente (Thompson *et al.*, *J Mol Biol.* 256(1):77-88, (1996)). Resumiendo, las partículas de scFv-fago se incubaron con LOX1 humano biotinilado recombinante en solución (biotinilado mediante aminas libres utilizando EZ LINK™ Sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo/Pierce, 21335)). A continuación se capturó el scFv unido al antígeno sobre microesferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynabeads® M280) siguiendo las recomendaciones del proveedor. A continuación, se recuperaron las partículas de scFv-fago seleccionadas tal como se ha descrito previamente (Osbourn *et al.*, *Immunotechnology*, 2(3):181-96, (1996)) y se repitió el proceso de selección en presencia de concentraciones decrecientes de LOX1 humano biotinilado (un ejemplo típico sería de 50 nM a 20 pM a lo largo de 4 rondas).

Se prepararon extractos periplasmáticos que contenían scFv crudos para un número representativo de scFv individuales a partir de los resultados de la selección dirigida por CDR y se cribaron en un formato de ensayo de competencia por el epítipo HTRF® (fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo) contra el anticuerpo original LOX514 tal como se describe en el Ejemplo 10, Ensayo 7. Los positivos del cribado, es decir, las variantes de scFv que mostraron un efecto inhibidor significativamente mejor cuando se compararon con el LOX514 original, se sometieron a secuenciación del ADN, se produjeron variantes únicas a partir de los resultados de CDR2 o CDR3 de la cadena pesada variable y CDR3 de la colección de la cadena ligera como scFv purificados y se estudiaron. A continuación, se seleccionaron algunos scFv y se convirtieron en IgG1-TM para una caracterización adicional. Los ejemplos típicos de los anticuerpos LOX514 optimizados obtenidos siguiendo esta estrategia incluyen: LX5140011, LX5140014, LX5140016 y LX5140038 (tal como se ha descrito en la Tabla 1 o la Figura 4).

Para generar una mejora adicional, los resultados de la selección aleatorizada con CDR que comprendía un número elevado de variantes de scFv con la capacidad de inhibir la unión del LOX514 original a LOX1 humano se recombinaron para formar colecciones en las cuales los clones contenían emparejamientos aleatorios de CDR2 de VH aleatorizada de manera individual con secuencias de CDR3 de VH o VL.

Se prepararon extractos periplasmáticos que contenían scFv crudos a partir de un número representativo de scFv individuales a partir de las colecciones de CH2/VH3 o VH2/VL3 recombinadas en el ensayo HTRF® de competencia por el

epítipo. Los positivos del cribado, es decir las variantes de scFv que mostraron un efecto inhibidor significativamente mejor cuando se compararon con el scFv original y que conduce a una prerrecombinación generada, se sometieron a
5 secuenciación del ADN, se produjeron variantes recombinadas únicas como scFv y se estudiaron. A continuación, se seleccionaron los scFv más activos y se convirtieron en IgG1-TM para una caracterización adicional. Los ejemplos típicos de anticuerpos LOX514 optimizados obtenidos a partir de estas
10 colecciones recombinadas fueron: LX5140092, LX5140093, LX5140094, LX5140108 y LX5140110 (tal como se describe en la Tabla 1 o la Figura 4).

Las alineaciones de la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas optimizadas para los anticuerpos
15 seleccionados del linaje de LOX514 se muestran en la Figura 4A. Las alineaciones de la secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras optimizadas para los anticuerpos seleccionados del linaje de LOX514 se muestran en la Figura 4B.

20 **EJEMPLO 5 - Aislamiento e identificación de las variantes de scFv contra LOX1 con una potencia optimizada obtenidas a partir de LOX696**

LOX696 se optimizó en primer lugar utilizando una selección de presentación en ribosomas en función de la
25 afinidad tal como se describe en los documentos EP494955, US5658754 y en Hanes *et al.* (Thompson *et al.*, *J. Mol. Biol.* 256(1):77-88 (1996)).

Se crearon colecciones grandes de scFv, en un formato de presentación en ribosomas, obtenidos a partir de la
30 secuencia scFv de LOX696 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos de las regiones determinantes de la

complementariedad 2 o 3 de la cadena pesada variable (VH) (CDR2-VH o CDR3-VH) o las regiones 3 determinantes de la complementariedad de la cadena ligera variable (VL) (CDR3-VL) utilizando técnicas habituales de biología molecular como se ha descrito (Thompson *et al.*, *J. Mol. Biol.* 256(1):77-88 (1996)). En el ADN, se añadió un promotor T7 en el extremo 5' para una transcripción eficaz en ARNm. En el ARNm, el constructo contuvo un sitio de unión al ribosoma procariota (secuencia de Shine-Dalgarno). En el extremo 3' de la cadena sencilla, se eliminó el codón de parada y se añadió una porción de gIII (gen III) del bacteriofago M13 para que funcionara como espaciador entre el polipéptido de scFv naciente y el ribosoma (Thompson *et al.*, *J. Mol. Biol.* 256(1):77-88 (1996)).

Las colecciones se sometieron a selecciones de presentación en ribosomas en función de la afinidad con el fin de seleccionar las variantes con una afinidad más elevada por LOX1 humano. Se esperaba que estas mostraran una mejor actividad inhibidora de la unión a LOX1 de oxLDL y los otros ligandos de LOX1. Se expresaron los scFv *in vitro* utilizando el sistema de producción de ARN a gran escala RIBOMAX™ (T7) (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante y un sistema de traducción exento de células. Los complejos de anticuerpo scFv-ribosoma-ARNm (ARM, por sus siglas en inglés) se incubaron en una solución con LOX1 humano biotinilado (biotinilado mediante las aminos libres utilizando EZ LINK™ Sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo/Pierce, producto: 21335)). Los complejos terciarios unidos de manera específica (LOX1:ARM) se capturaron sobre microesferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (DYNABEADS® M-280) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Dyna) mientras que los ARM

no unidos se eliminaron con lavados. El ARNm que codifica los scFv unidos se recuperó a continuación mediante retrotranscripción-PCR (RT-PCR). Se repitió el proceso de selección con la población obtenida en rondas adicionales de
5 selección con concentraciones decrecientes de LOX1 humano biotinilado (de 1 μ M a un mínimo de 2 nM en 4 rondas) con el fin de lograr un enriquecimiento en clones con una afinidad mayor por LOX1. Los resultados de las rondas de selección 2, 3 y 4 se subclonaron en pCantab6 (1) para la expresión
10 bacteriana como scFv y se identificaron los clones mejorados como extractos periplasmáticos en un ensayo de competencia por el epítipo LOX696 (remítase al Ejemplo 10, Ensayo 7) tal como se describe en el Ejemplo 4.

Se generaron colecciones de presentación en fagos de
15 segunda generación en función de los resultados de la presentación en ribosomas aleatorizados con CDR de LOX696 o variantes. Se generaron un total de cuatro colecciones: (1) recombinando las secuencias de CDR2 de VH con las secuencias de CDR3 de VL, ambas de los resultados de la ronda 2; (2)
20 llevando a cabo una PCR propensa a error adicional con la colección CDR2 de VH X CDR3 de VL recombinada (véase anteriormente) para incorporar una mayor diversidad secuencial utilizando el kit de mutagénesis aleatoria con PCR DIVERSIFY™ (BD Biosciences) siguiendo las
25 recomendaciones del fabricante; (3) mediante mutagénesis aleatoria en la secuencia completa de scFv utilizando la PCR propensa a error tal como se ha descrito anteriormente utilizando como molde un conjunto de 9 resultados positivos de ADN de scFv provenientes de las colecciones de
30 presentación ribosomas tempranas más ADN de scFv original de LOX696 con una relación equimolar; (4) mediante la

aleatorización suave de la CDR VH completa, tal como se describe en Gallop MA *et al.*, J Med Chem, 37(9):1233-51 (1994) utilizando como molde un conjunto de resultados positivos de ADN de scFv provenientes de las colecciones de CDR3 de VL de presentación de ribosomas tempranas más el ADN de scFv original de LOX696 con una relación equimolar.

Las selecciones de presentación en fagos se realizaron tal como se ha descrito en el Ejemplo 4 utilizando concentraciones decrecientes de LOX1 biotinilado (normalmente de 100 nM a 2 pM en cuatro rondas). Se prepararon extractos periplasmáticos que contenían scFv crudos de un número representativo de scFv individuales a partir de diferentes colecciones de 2.^a generación y se estudiaron en el ensayo HTRF® de competencia por el epítipo (tal como se ha descrito en el Ejemplo 10, Ensayo 7). Las variantes de scFv que proporcionaron la competencia de unión más elevada se secuenciaron de nuevo y se prepararon los scFv purificados como en el Ejemplo 1 para su estudio. Los scFv más potentes de esas colecciones de segunda generación se convirtieron en el formato IgG1-TM para una caracterización adicional como se describe en los ejemplos posteriores.

Los ejemplos típicos de anticuerpos LOX696 optimizados obtenidos de estas colecciones de 2.^a generación incluyen: LX6960067_ngl1, LX6960071_ngl1, LX6960073_ngl1, LX6960086_ngl1, LX6960094_ngl1, LX6960101_ngl1, LX6960102_ngl1 y LX6960116_ngl1 (tal como se describe en la Tabla 1 o la Figura 5).

Las alineaciones de la secuencia de aminoácidos de la VH optimizada de los anticuerpos seleccionados del linaje de LOX696 se muestran en la Figura 5A. Las alineaciones de la

secuencia de aminoácidos de la VH optimizada de los anticuerpos seleccionados del linaje de L0696 se muestran en la Figura 5B.

EJEMPLO 6 - Germinalización y manipulación de la estabilidad de los anticuerpos contra LOX1 como IgG1-TM

Se alinearon la secuencia de aminoácidos de VH y VL de LOX514 respecto a las secuencias de la línea germinal humanas conocidas de la base de datos VBASE (Tomlinson, I., VBASE. 1997, Centro para la Manipulación de Proteínas MRC, Cambridge, UK) y se identificó la línea germinal más cercana por similitud secuencial. Para el dominio VH esta fue VH1-24 (DP-5) y JH6, para el dominio VL esta fue V λ 1-e (DPL-8) y JL3. Existe únicamente una diferencia en las dos alineaciones ubicada en el armazón 4 de la cadena pesada. Ese único residuo (R105 - numeración Kabat) se ha revertido al residuo de la línea germinal (Q) durante el proceso de conversión de la IgG mediante biología molecular estándar, lo que significa que todas las IgG optimizadas del linaje de LOX514 se produjeron de hecho en el formato germinalizado. Además, se realizó la mutagénesis N96D de la cadena pesada (numeración Kabat) para eliminar un posible motivo de N-desamidación en la CDR3 de LX5140092 y LX5140093. Las variantes se denominaron LX5140092_N>D y LX5140093_N>D respectivamente (remítase a la Tabla 1 o la Figura 4). En las Figuras 4A y 4B respectivamente, se proporciona una alineación de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera de LX5140092_N>D y LX5140093_N>D.

De manera similar, también se llevó a cabo un análisis de la línea germinal del anticuerpo L0696. Se identificó la línea germinal más cercana como VH3-09 (DP-31) y JH3 para la cadena pesada y V λ 2a2 (DPL-11) y JL3 para la cadena ligera.

Excluidos los residuos de Vernier (Foote, *et al.*, *J Mol. Biol.*, 224:487 (1992)), se detectaron cinco diferencias en total, todas en la VH: dos en el armazón 1, una en el armazón 3 y dos en el armazón 4. Las diferencias en las secuencias de la IgG1-TM de LOX696 optimizadas se revirtieron a los residuos de la línea germinal más cercanos con la excepción de V89 mediante técnicas estándar de biología molecular: Q1E, Q6E, R105Q y T108M. De manera adicional, se realizó una mutagénesis G82bS la cadena pesada (numeración de Kabat) para eliminar un posible motivo de N-desamidación en el armazón 3 de LX6960073_g1 germinalizado (remítase a la Tabla 1 o la Figura 5). La variante se denominó LX6960073_G82bS_g1 (remítase a la Tabla 1 o la Figura 5). En las Figuras 5A y 5B respectivamente, se proporciona una alineación de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera de LX6960073_ngl1 no germinalizada, LX6960073_g1 y LX6960073_G82bS_g1 germinalizadas.

EJEMPLO 7 - Especificidad y reactividad cruzada entre especies de anticuerpos contra LOX1 optimizados

Se evaluó la especificidad de los anticuerpos contra LOX1 humano optimizados como IgG1-TM por otras moléculas relacionadas con el receptor depurador y de lectina de tipo C humana mediante un ELISA de unión a IgG (tal como se describe en el Ejemplo 10, Ensayo 7). El grupo de moléculas relacionadas incluyó CLEC-7A humano (Dectina-1), CLEC-1A humano, CLEC-4L humano (DC-SIGN), CLEC-1B humano (CLEC-2), SR-A1 humano y SR-B3 humano (CD36). También se recubrió con LOX1 humano como control positivo de la unión. Se estudiaron los siguientes anticuerpos optimizados: LX5140108, LX5140110, LX5140092_N>D, LX5140093_N>D, LX6960073_g1 y LX6960073_G82bS_g1. Se incluyó el anticuerpo de control del

isotipo humano IgG1-TM NIP228 en el grupo de anticuerpos que se estudiaron para determinar el nivel del fondo no específico.

5 Tal como se muestra en la Figura 6, todos los anticuerpos contra LOX1 optimizados se unen a LOX1 humano, pero no se unen a CLEC-7A, CLEC-1A, CLEC-4L, CLEC-1B, SR-A1 ni SR-B3 humanos, con lo que se demuestra la especificidad de LX5140108, LX5140110, LX5140092_N>D, LX5140093_N>D, LX6960073_gl y LX6960073_G82bS_gl por LOX1 humano.

10 Se evaluó la reactividad cruzada de los anticuerpos contra LOX1 humano respecto a ortólogos de LOX1 de varias especies mediante un ELISA de unión a IgG (tal como se describe en el Ejemplo 10, Ensayo 7). Resumiendo, se utilizaron 5 µg/mL de (HisFlag)-(LOX1 humano), (LOX1 de cinomolgo)-(FlagHis), (LOX1 de ratón)-(FlagHis), (LOX1 de rata)-(FlagHis) y (LOX1 de conejo)-(FlagHis) en tampón PBS, para recubrir placas MAXISORP™. Después de bloquear con PBS que contenía un 3% de leche en polvo, se incubaron 10 µg/mL de la IgG1-TM contra LOX1 purificada en tampón de bloqueo
15 con los diferentes recubrimientos de antígeno. Se detectaron las moléculas de IgG unidas utilizando 100 ng/mL de un anticuerpo secundario marcado con Europio contra la IgG humana (Perkin Elmer). Las placas se leyeron para detectar la fluorescencia utilizando una excitación a 340 nm y emisión
20 a 615 nm. Se determinó la unión no específica al antígeno CD86 FlagHis también con un recubrimiento con 5 µg/mL. Se estudiaron los siguientes anticuerpos contra LOX1 optimizados así como también IgG1-TM humana NIP228 como control negativo: LX5140108, LX5140110, LX5140092_N>D, LX5140093_N>D, LX6960073_gl y LX6960073_G82bS_gl. Tal como
25 30 se muestra en la Figura 7A, todos los anticuerpos estudiados

(LX5140108, LX5140110, LX5140092_N>D, LX5140093_N>D, LX6960073_gl y LX6960073_G82bS_gl) se unen a LOX1 humano y de cinomolgo pero no a las proteínas LOX1 de ratón o de rata. Algunos de estos anticuerpos (LX5140108, LX5140110 y
5 LX5140092_N>D) también se unen a LOX1 de conejo pero en menor grado que a LOX1 humano o de cinomolgo, tal como lo demuestra un recuento de fluorescencia menor.

Se llevó a cabo la caracterización de la reactividad cruzada entre LOX1 humano y de cinomolgo para los anticuerpos
10 IgG1-TM contra LOX1 optimizados LX5140108, LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl mediante un ELISA competitivo.

Resumiendo, se utilizaron 0.125 µg/mL de LOX1 humano biotinilado en PBS para recubrir placas de estreptavidina (Abgene). Después de bloquear con PBS que contenía un 3% de
15 leche en polvo, se coincubaron 12.5 ng/mL de IgG1-TM contra LOX1 purificada en tampón de bloqueo con proteínas LOX1 humanas o de cinomolgo competidoras. Se utilizó una valoración 1:3 del competidor en tampón de bloqueo comenzando con una concentración de 400 nM para LX5140108 y LX5140110
20 y de 2 µM para LX6960073_G82bS_gl. Se detectaron las moléculas de IgG contra LOX1 unidas utilizando 100 ng/mL de un anticuerpo secundario marcado con Europio contra la IgG humana (Perkin Elmer). Las placas se leyeron para detectar la fluorescencia utilizando una excitación a 340 nm y emisión
25 a 615 nm.

Tal como se muestra a continuación en la Figura 7B y en la Tabla 3, las tres IgG1-TM contra LOX1 optimizadas (LX5140108, LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl) compiten con
30 LOX1 de cinomolgo y muestran una CI50 dentro de un intervalo de 5 veces de la CI50 para una competencia con LOX1 humano, con lo que se demuestra que la reactividad cruzada con

cinomolgo de los anticuerpos contra LOX1 LX5140108, LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl es fuerte.

Tabla 3: Unión del anticuerpo optimizado respecto a LOX1 de cinomolgo y LOX1 humano

5	Anticuerpos contra LOX1	CI50 para la competencia con huLOX1 (M)	CI50 para la competencia con cinoLOX1 (M)
	LX5140108	2.2×10^{-10}	2.5×10^{-10}
	LX5140110	2.8×10^{-8}	4.4×10^{-8}
10	LX6960073_G82bS_gl	5.5×10^{-10}	1.8×10^{-9}

EJEMPLO 8 - Afinidad de los anticuerpos contra LOX1 optimizados por hLOX1 determinada según BIACORE™ y KinExATM

15 Se determinó la afinidad del anticuerpo contra LOX1 por el dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de LOX1 de ortólogos humanos y de cinomolgo a 37 °C utilizando una monitorización de la interacción en tiempo real mediante Biacore (para humano y cino) y en equilibrio utilizando KinExA (para las mediciones de la afinidad por LOX1 humano).

20 En el ensayo con Biacore, se inmovilizaron la proteína G recombinante más el anticuerpo contra LOX1 capturado por la proteína G mediante la unión de la amina a una superficie de la micromatriz CM5, y se registraron los perfiles de asociación y disociación de los ortólogos de LOX1 que pasaron sobre la superficie. Los ensayos se realizaron con la temperatura IFC fijada a 37 °C y el compartimento a la muestra se dejó a temperatura ambiente. Todos los experimentos se llevaron a cabo con tampón de ejecución HBSEP
25 que se hizo pasar a través del IFC de manera constante a 30 μ L/min. Al final de cada aplicación de LOX1 se eliminó cualquier anticuerpo unido y complejo con el anticuerpo de

la proteína G mediante dos pulsos de glicina 10 mM, pH 1.5 de 40 s. La cantidad del anticuerpo contra LOX1 capturado sobre la superficie de la proteína G se adaptó para evitar en primer lugar las limitaciones debidas al transporte másico y, en segundo lugar, para garantizar que se pudiera observar una disociación suficiente para una modelización exacta. El intervalo de concentración del LOX1 de interacción fue suficiente para garantizar que se observara el intervalo completo de unión entre la saturación del anticuerpo y la ausencia de unión detectable. Los datos se analizaron utilizando el software de evaluación BiaEval tras una doble sustracción de la referencia de un perfil únicamente con anticuerpo cuerpo.

El ensayo de equilibrio en solución se llevó a cabo con una concentración única de un anticuerpo contra LOX1 en el cual se realizó una titulación del ECD de LOX1 humano recombinante desde 100 veces por encima hasta 100 veces por debajo de la concentración del anticuerpo. Se determinó la concentración del anticuerpo libre mediante la captura del anticuerpo no ocupado que se detectó posteriormente mediante una sonda específica de Fc humano marcada de manera fluorescente. En la tabla 4 se detallan las constantes de velocidad observadas y las afinidades globales.

Tabla 4: Afinidad por LX5140110 y constantes de velocidad

Ligando/LOX1	Ensayo	Velocidad de asociación (1/Ms)	Velocidad de disociación (1/s)	KD (pM)
Humano	Biacore	5.75e5	2.30e-4	401
Cinomo lgo	Biacore	1.09e6	1.68e-4	154

Humano	KinExA	n/a	n/a	de 378 a 587 pM
--------	--------	-----	-----	-----------------------

5 **EJEMPLO 9 - Los anticuerpos contra LOX1 optimizados demuestran inhibición de la unión multiligando, internalización de oxLDL y la señalización inducida por oxLDL**

Se estudiaron las IgG purificadas para determinar su capacidad de inhibir de manera específica la unión de oxLDL, AGE-BSA y CRP a LOX1 (remítase al Ejemplo 10; ensayos 1, 2 y 3). Se estudiaron varios clones aislados incluidos LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl para determinar su capacidad de bloquear la unión de oxLDL, AGE-BSA y CRP a LOX1. Se muestran gráficos representativos en las Figuras 8A, 8B y 8C donde se muestra la inhibición de la unión de oxLDL, AGE-BSA y CRP, respectivamente, por parte de LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl. Para confirmar que los anticuerpos reaccionan de manera cruzada y que tienen una actividad funcional en SNP K167N de LOX1, se estudiaron los anticuerpos para determinar su capacidad de bloquear la unión de oxLDL a SNP K167N de LOX1. Se muestran gráficos representativos en la Figura 8D donde se muestra que tanto LX5140110 como LX6960073_G82bS_gl bloquean la unión de oxLDL a la variante SNP K167N de LOX1. Además de la inhibición de la unión, se estudiaron varios clones aislados que incluían LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl para determinar su capacidad de bloquear la internalización de oxLDL en células que expresan LOX1 (remítase al Ejemplo 10, Ensayo 4) y la señalización de LOX1 inducida por oxLDL (remítase al Ejemplo 10, Ensayo 5). Se muestran gráficos representativos en las Figuras 8A y 8F donde se muestra la inhibición de la internalización de oxLDL

y la señalización de LOX1 inducida por oxLDL, respectivamente, por parte de LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl. Los resultados de estos estudios se resumen en la Tabla 5.

5 Tabla 5: Inhibición del anticuerpo contra LOX1 optimizado de la internalización y señalización de oxLDL

		LOX514_110	LX6960073_G82bS
10	oxLDL/ hLOX1 CHO	Media	1.04663E-10
	Competición	DE	1.91372E-10
		n	3
	oxLDL/ K167N hLOX1 CHO	Media	4.92E-10
	Competición	DE	5.40E-10
		n	7
	oxLDL/ hLOX1 CHO	Media	3.1223E-10
	Internalización	DE	1.12532E-10
		n	3
15	AGE BSA/ hLOX1 CHO	Media	2.07257E-11
	Competición	DE	1.27853E-10
		n	3
	CRP/ hLOX1	Media	5.01529E-09
	Competición	DE	6.37843E-09
		n	3
20	ENSAYO ROS	Media	1.98E-09
		DE	4.47E-10
		n	3

Con estos resultados se demuestra la inhibición específica, multiligando de la unión de oxLDL, AGE-BSA y CRP a LOX1 por parte de los anticuerpos LX5140110 y LX6960073_G82bS_gl y que tanto LX5140110 como LX6960073_G82bS_gl reaccionan de manera cruzada desde un punto de vista funcional con la variante SNP K167N de LOX1 común e inhiben la internalización de oxLDL y la señalización de LOX1 inducida por oxLDL.

EJEMPLO 10 – Materiales y métodos

Se utilizaron los siguientes materiales y métodos en los experimentos descritos en los Ejemplos 1-9.

Materiales

Hiclato de doxiciclina (Sigma n.º D9891-1G); CarboxiH2DCFDA (MolecularProbes n.º C400); tinte Hoechst (Molecular probes n.º 33342); AGE-BSA (Biovision n.º 2221-10); PBS (Gibco n.º 14190); Proteína C-reactiva recombinante (R&D n.º 1707-CRCF); BSA al 30% (SIGMA n.º A9576); Kit rápido de conjugación con biotina Lightning Link (Innova Biosciences n.º 704-0010); ÉSTER de NHS y DyLight 649 (Thermo Scientific n.º 46416); Mono NHS Cypher 5E; Éster (GE healthcare n.º PA15401); HBSS (1X) (GIBCO #14025); Corning 384 Cell; placa de ensayo negra de unión (Corning Costar n.º 3683); Solución potenciadora Delfia (Perkin Elmer n.º 4001-0010); Europio-Estreptavidina (Perkin Elmer n.º 1244-360); columnas desaladoras Zeba de 0.5 mL (Pierce n.º 89883); CHO-TREx (Invitrogen n.º R718-07); oxLDL (Intracel n.º RP049); DiI-oxLDL (Intracel n.º RP-173); Anticuerpo contra LOX1 (Biovision n.º 3659); tinte Hoechst (Molecular probes n.º 33342); PBS (Gibco n.º 14190); Medio de cultivo: Hams:F12-GlutaMax-I (Gibco n.º 31765-027); complementado con un 10% de suero bovino fetal (Invitrogen n.º 16000-044); Blasticidina (Invitrogen n.º 46-1120); Zeocina (Invitrogen n.º R25001); Lipofectamina (Invitrogen n.º 11668-019); Hiclato de doxiciclina (Sigma n.º D9891-1G).

Modificaciones de reactivos

Marcaje con Cypher 5E de oxLDL

Se ajustó el pH de ox-LDL (1 mg/mL) a un pH de 8.5 utilizando un volumen de 1/10 de tampón de borato de sodio 0.5 M y se marcó la oxLDL según las instrucciones del fabricante del kit con relaciones molares proteína:tinte de 40:1 (1 h a temperatura ambiente en la oscuridad). Se eliminó el tinte que no había reaccionado utilizando columnas de centrifugación Zeba según las instrucciones del fabricante

(Monoéster de NHS y Cypher 5E de GE healthcare) y se intercambió el tampón por PBS. La proteína marcada se guardó a 4 °C en la oscuridad. A la hora de realizar los cálculos, se asume que se ha recuperado más de un 95% de proteína y que no hay factores de dilución que han de tenerse en cuenta.

Marcaje con DyLight 649 de oxLDL y AGE-BSA

Se ajustó el pH de ox-LDL o AGE-BSA (1 mg/mL) a un pH de 8.5 utilizando un volumen de 1/10 de tampón de borato de sodio 0.5 M y se marcó según las instrucciones del fabricante (éster de NHS y DyLight 649 de Thermo Scientific durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad). Se eliminó el tinte que no había reaccionado utilizando columnas de centrifugación Zeba según las instrucciones del fabricante y se intercambió el tampón por PBS. A la hora de realizar los cálculos, se asume que se ha recuperado más de un 95% de proteína y que no hay factores de dilución que han de tenerse en cuenta.

Marcaje con DyLight 649 de anticuerpos contra LOX1 humanos

Se ajustó el pH del anticuerpo contra LOX1 humano (1 mg/mL) a un pH de 8.5 utilizando un volumen de 1/10 de tampón de borato de sodio 0.5 M y se marcó según las instrucciones del fabricante (éster de NHS y DyLight 649 de Thermo Scientific durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad). Se eliminó el tinte que no había reaccionado utilizando columnas de centrifugación Zeba según las instrucciones del fabricante y se intercambió el tampón por PBS. A la hora de realizar los cálculos, se asume que se ha recuperado más de un 95% de proteína y que no hay factores de dilución que han de tenerse en cuenta.

Marcaje con biotina de CRP

Se reconstituyó la proteína C-reactiva (R&D systems; exenta de portador) en agua destilada para obtener una concentración de 4 mg/mL y se biotiniló según las instrucciones del kit suministradas con el kit de conjugación
5 con biotina Lightning-Link™ (Tipo A).

Línea celular 3A9 CHO-TREX con LOX1 humano

Se utilizó el gen LOX1 humano (NM 002543) para generar el plásmido recombinante pcDNA4/T0-LOX1 (pAM2037), que sintetizó y suministró Geneart. Se sintetizó el gen LOX1
10 añadiendo el sitio de restricción Afl II y una secuencia Kozak en el extremo 5', y un sitio de restricción EcoRI en el extremo 3'. A continuación, se utilizó pAM2037 para transfectar células de ovario de hámster chino que expresaban el represor de tetraciclina (células CHO-TREx) utilizando
15 lipofectamina2000. CHO-TREx es una línea celular CHO-K que contiene pcDNA/TR que tiene el gen para el represor de la tetraciclina (Tet), que bloqueará la expresión de los genes clonados en el pcDNA4/T0. Cuando estas células se tratan con tetraciclina, se libera la represión y se expresa el gen
20 LOX1.

La población mixta transfectada de células se clasificó utilizando un aparato FACS en placas de 96 pocillos para obtener una única célula en cada pocillo. Se seleccionó pcDNA6/TR con 10 µg/mL de blasticidina, y se utilizaron
25 300 µg/mL de zeocina para seleccionar el plásmido pcDNA4T0-LOX1 y 200 µg/mL para el mantenimiento. Las células individuales se propagaron y se seleccionaron los clones estables por su capacidad de unirse a oxLDL marcada con DiI e internalizarla, utilizando una estrategia de Análisis
30 Informático Ultrarrápido para cuantificar la fluorescencia captada por las células. Se seleccionó un clon por su

captación de DiI-oxLDL y estabilidad a lo largo de varios pases de crecimiento. Se verificó la expresión superficial de la proteína LOX1 mediante inmunotinción utilizando un anticuerpo específico contra LOX1 de Biovision. Se demostró la actividad funcional de la proteína LOX1 mediante la captación de oxLDL y la generación de una respuesta de ROS mediada por oxLDL en las células CHO-TREx-LOX1.

ENSAYOS 1 y 2 - Ensayos de unión LOX1:oxLDL y LOX1:AGE-BSA

10 Curva de unión de saturación

Se diluyeron 1:50 oxLDL y AGE-BSA marcados con DyLight 649 (1 mg/mL) en HBSS y se realizó una titulación en una placa de 384 pocillos utilizando una dilución en serie 1+1 en 16 puntos por triplicado. Para la determinación de la unión total, se añadieron 10 µL de HBSS a todos los pocillos y después se añadieron 10 µL de células CHO TREx transfectadas con LOX1 humano (4000 células por pocillo)). Para la determinación de la unión no específica, se reemplazaron 10 µL de HBSS por 10 µL de oxLDL no marcada (1 mg/mL). La placa de ensayo se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, se leyeron las placas en un sistema de detección celular 8200 de Applied Biosystems (lector de placas FMAT) utilizando una configuración PMT1 de 442 con un recuento mínimo fijado en 10; color < 4 y FL1 < 5600. Se determinó la unión específica sustrayendo la señal de unión total media de la señal de unión no específica media y representando gráficamente la isoterma de unión resultante con un software Prism Graphpad utilizando un algoritmo de unión específico de un sitio. La concentración calculada a la cual se determinó la KD se

utilizó para un cribado ultrarrápido posterior y los experimentos de competencia con el anticuerpo.

Evaluación de los anticuerpos monoclonales contra hLOX1

Se llevó a cabo un ensayo de competencia entre los anticuerpos contra LOX1 y ligando marcado con DyLight 649 (oxLDL; AGE-BSA) por la unión al receptor LOX1 expresado en células CHO TREX de la siguiente manera.

Se utilizaron los anticuerpos competidores sin ninguna dilución previa y se titularon en una placa de 384 pocillos utilizando una dilución en serie 1+1 en tampón de ensayo (HBSS) en 24 puntos por duplicado (10 µL por pocillo). Se añadieron los ligandos marcados con DyLight 649 (en su concentración de KD respectiva) a todos los pocillos que contenían anticuerpo (10 µL por pocillo) y después se añadieron células CHO TREX transfectadas con LOX1 humano (4000 células por pocillo en 10 µL) o células CHO TREX transfectadas con SNP K167N.

Las placas de ensayo se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, se leyeron las placas en un sistema de detección celular 8200 de Applied Biosystems (lector de placas FMAT) utilizando una configuración PMT1 de 442 con un recuento mínimo fijado en 10; color < 4 y FL1 < 5600. Los datos se analizaron utilizando una ecuación logística de 4 parámetros con la versión 5 de GRAPHPAD™ Prism (GraphPad Inc, California) para determinar los valores de la IC50 aparente. $Y = \text{Parte inferior} + ((\text{Parte superior}) - (\text{Parte inferior})) / (1 + 10^{((\text{Log CI50} - X) * \text{Pendiente de Hill}))}$ donde X es el logaritmo de la concentración e Y es el % de unión específica. La CI50 es la concentración de la muestra que produce una inhibición de la unión específica de un 50%.

Tabla 6. Concentraciones madre utilizadas en los ensayos de unión con oxLDL y AGE-BSA

Condiciones del ensayo para los ensayos de HTS y la CI₅₀		
5		Conc. de la solución de trabajo
		Conc. del ensayo final
10	oxLDL marcada con DyLight 649	8.7 nM
	AGE BSA marcado con DyLight 649	2.9 nM
	AGE BSA marcado con DyLight 649	7.5 µg/mL
15	Células CHO TREX transfectadas con hLOX1	2.5 µg/mL
	Material peri-prep para HTS (ensayo de unión con oxLDL)	4x10 ⁵ células/mL
	Muestras de scFv/IgG purificadas para el análisis de la CI₅₀	4000 células/pocillo
20		100%
		30%
		Dilución en serie 1+1 de proteínas purificadas en 24 puntos
		30%

ENSAYO 3 - Ensayo de unión LOX1:CRP

Curva de unión de saturación

Se inmovilizó LOX1 (R&D systems) sobre la superficie de una placa de 384 pocillos Nunc Maxisorp con una concentración de 3 µg/mL en PBS, durante toda la noche a 4 °C (25 µL por pocillo). El día siguiente, se lavó la placa de ensayo 12x en PBS (sin calcio ni magnesio). Se preparó una solución de trabajo de CRP biotinilada con una concentración de 20 µg/mL (769 nM) en PBS/0.1% de BSA/0.01% de tween 20, y se tituló en una placa de 384 pocillos utilizando una dilución en serie 1+1 en 16 puntos por triplicado (12.5 µL por pocillo). Se

añadieron en cada pocillo 12.5 µL más de tampón de ensayo (en PBS/0.1% de BSA/0.01% de tween 20) y la placa de ensayo se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 16x en PBS/0.01% de Tween 20 y después se añadieron
5 50 µL de estreptavidina marcada con Europio (dilución 1:1000). Se incubó la placa de ensayo durante 1 h más a temperatura ambiente y después se lavó 16x en PBS/0.01% de Tween 20. Se desarrolló la placa añadiendo 100 µL/pocillo de solución potenciadora DELFIA, y se leyó en un lector de
10 placas Wallac Victor V utilizando el protocolo de europio DELFA instalado en la fábrica. Se representó gráficamente la isoterma de unión resultante con un software Prism Graphpad utilizando un algoritmo de unión específica de un sitio. La concentración calculada, a la cual se determinó la K_D
15 aparente, se utilizó para un cribado ultrarrápido posterior y los experimentos de competencia con el anticuerpo.

Evaluación de los anticuerpos monoclonales contra LOX1 humano

Se realizó un ensayo de competencia entre el anticuerpo
20 y la CRP marcada con biotina por el LOX1 humano recombinante de la siguiente manera: se inmovilizó LOX1 (R&D systems) sobre la superficie de una placa de ensayo de 384 pocillos Nunc Maxisorp con una concentración de 3 µg/mL en PBS, durante toda la noche a 4 °C (25 µL por pocillo). El día
25 siguiente, se lavó la placa de ensayo 12x en PBS (sin calcio ni magnesio). Se utilizaron los anticuerpos competidores sin ninguna dilución previa y se titularon en una placa de dilución de 384 pocillos utilizando una dilución en serie 1+1 en tampón de ensayo (PBS/0.1% de BSA/0.01% de tween 20)
30 en 24 puntos por duplicado (30 µL por pocillo). A continuación se añadió la CRP marcada con biotina (30 µL por

pocillo a la concentración de K_D) a todos los pocillos que contenían anticuerpo. A continuación, se transfirieron las muestras (50 μ L) desde la placa de dilución hasta la placa de ensayo que contenía el LOX1 humano recombinante inmovilizado utilizando un robot de manipulación de líquidos 384 MiniTrak. Las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 16x en PBS/0.01% de Tween 20 y después se añadieron 50 μ L de estreptavidina marcada con Europio (dilución 1:1000). Se incubó la placa de ensayo durante 1 h más a temperatura ambiente y después se lavó 16x en PBS/0.01% de Tween 20. Se desarrolló la placa añadiendo 100 μ L/pocillo de solución potenciadora DELFIA, y se leyó en un lector de placas Wallac Victor V utilizando el protocolo de europio DELFA instalado en la fábrica. Los datos se analizaron utilizando una ecuación logística de 4 parámetros con la versión 5 de GRAPHPAD™ Prism (GraphPad Inc, California) para determinar los valores de la IC_{50} aparente. $Y = \text{Parte inferior} + ((\text{Parte superior}) - (\text{Parte inferior})) / (1 + 10^{((\text{Log } CI_{50} - X) * \text{Pendiente de Hill}))}$ donde X es el logaritmo de la concentración e Y es el % de unión específica. La CI_{50} es la concentración de la muestra que produce una inhibición de la unión específica de un 50%.

Tabla 7. Concentraciones madre utilizadas en los ensayos de unión a CRP

Condiciones del ensayo para los ensayos de HTS y la CI_{50}		
	Conc. de la solución de trabajo	Conc. del ensayo final
CRP marcada con biotina	784 nM	6.12 nM

5

LOX1 recombinante	39.2 μ M	0.11 μ M
Estreptavidina marcada con Europio	0.1mg/mL	0.1 μ g/mL
Muestras de scFv/IgG purificadas para el análisis de la CI₅₀	Dilución en serie 1+1 de proteínas purificadas en 24 puntos	50%

ENSAYO 4 - Ensayo de internalización de LOX1:oxLDL
Curva de unión de saturación

10

15

Se diluyó 1:50 oxLDL marcada con Cypher 5E (relación molar 40:1, con una concentración de 1 mg/mL) en HBSS y se realizó una titulación en una placa de 384 pocillos utilizando una dilución en serie 1+1 en 16 puntos por triplicado. Para la determinación de la unión total, se añadieron 10 μ L de HBSS a todos los pocillos y después se añadieron 10 μ L de células CHO TREX transfectadas con LOX1 humano (4000 células por pocillo)). Para la determinación de la unión no específica, se reemplazaron 10 μ L de HBSS por 10 μ L de oxLDL no marcada (1 mg/mL).

20

25

30

La placa de ensayo se incubó durante 1 h a 37 °C. Se realizó un experimento en paralelo en el que todos los reactivos se mantuvieron a 4 °C con el fin de demostrar que la internalización era un proceso activo desde un punto de vista metabólico. Tras la incubación, se leyeron las placas en un sistema de detección celular 8200 de Applied Biosystems (lector de placas FMAT) utilizando una configuración PMT1 de 442 con un recuento mínimo fijado en 10; color < 4 y FL1 < 5600. Se determinó la unión específica sustrayendo la señal de unión total media de la señal de unión no específica media y representando gráficamente la isoterma de unión resultante con un software Prism Graphpad utilizando un algoritmo de

unión específico de un sitio. La concentración calculada a la cual se determinó la K_D se utilizó para un cribado ultrarrápido posterior y los experimentos de competencia con el anticuerpo.

5 **Evaluación de los anticuerpos monoclonales contra hLOX1**

Se realizó un ensayo de competencia entre los anticuerpos contra LOX1 y ox-LDL marcada con Cypher5E por la internalización en células CHO TREX que expresaban el receptor LOX1 de la siguiente manera.

10 Se utilizaron los anticuerpos competidores sin ninguna dilución previa y se titularon en una placa de 384 pocillos utilizando una dilución en serie 1+1 en tampón de ensayo (HBSS) en 24 puntos por duplicado (10 μ L por pocillo). Se añadieron los ligandos marcados con Dylight 649 (en su
15 concentración de K_D respectiva) a todos los pocillos se contenían anticuerpo (10 μ L por pocillo) y después se añadieron células CHO TREX transfectadas con LOX1 humano (4000 células por pocillo en 10 μ L) o células CHO TREX transfectadas con SNP K167N.

20 Las placas de ensayo se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, se leyeron las placas en un sistema de detección celular 8200 de Applied Biosystems (lector de placas FMAT) utilizando una configuración PMT1 de 442 con un recuento mínimo fijado en
25 10. Color < 0.4 y FL1 < 5600. Los datos se analizaron utilizando una ecuación logística de 4 parámetros con la versión 5 de GRAPHPAD™ Prism (GraphPad Inc, California) para determinar los valores de la IC_{50} aparente. $Y = \text{Parte inferior} + ((\text{Parte superior}) - (\text{Parte inferior})) / (1 + 10^{((\text{Log } CI_{50} - X) * \text{Pendiente de Hill}))}$ donde X es el logaritmo de la
30 concentración e Y es el % de unión específica. La CI_{50} es la

concentración de la muestra que produce una inhibición de la unión específica de un 50%.

Tabla 8. Concentraciones madre utilizadas en los ensayos de internalización de oxLDL

5	Condiciones del ensayo para los ensayos de HTS y la CI_{50}		
		Conc. de la solución de trabajo	Conc. del ensayo final
10	oxLDL marcada con Cyper5E	9.6 nM	3.2 nM
	Células CHO TREX transfectadas con LOX1 humano	4x10 ⁵ células/mL	4000 células por pocillo
15	Muestras de scFv/IgG purificadas para el análisis de la CI_{50}	Dilución en serie 1+1 de proteínas purificadas en 24 puntos	30%

20 **ENSAYO 5 - Inducción de ROS en células CHO-LOX1 recombinantes**

Preparación de las células

Se indujeron células CHO TREX transfectadas con LOX1 humano 24 h antes de llevar a cabo los experimentos con 1 µg/mL (concentración final) de doxiciclina. El día del experimento, se separaron las células raspando y se centrifugaron durante 5 min a 1200 rpm. Se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 50 mL de PBS y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min. Este procedimiento se repitió dos veces. Se desechó el sobrenadante resultante y el sedimento celular se

resuspendió en 5 mL de HBSS. Se contaron las células en un hemocitómetro utilizando el método de exclusión con azul triptano. Se ajustó el número de células para que hubiera 4×10^5 células en total. Las células se mantuvieron en hielo hasta su uso.

Curva de unión de saturación

Se diluyó 1:50 oxLDL marcada con Cypher 5E (relación molar 40:1, con una concentración de 1 mg/mL) en HBSS y se realizó una titulación en una placa de 384 pocillos utilizando una dilución en serie 1+1 en 16 puntos por triplicado. Para la determinación de la unión total, se añadieron 10 µL de HBSS a todos los pocillos y después se añadieron 10 µL de células CHO TREX transfectadas con LOX1 humano (4000 células por pocillo)). Para la determinación de la unión no específica, se reemplazaron 10 µL de HBSS por 10 µL de oxLDL no marcada (1 mg/mL).

La placa de ensayo se incubó durante 1 h a 37 °C. Se realizó un experimento en paralelo en el que todos los reactivos se mantuvieron a 4 °C con el fin de demostrar que la internalización era un proceso activo desde un punto de vista metabólico.

Tras la incubación, se leyeron las placas en un sistema de detección celular 8200 de Applied Biosystems (lector de placas FMAT) utilizando una configuración PMT1 de 442 con un recuento mínimo fijado en 10; color < 4 y FL1 < 5600.

Se determinó la unión específica sustrayendo la señal de unión total media de la señal de unión no específica media y representando gráficamente la isoterma de unión resultante con un software Prism Graphpad utilizando un algoritmo de unión específico de un sitio. La concentración calculada a la cual se determinó la K_D se utilizó para un cribado

ultrarrápido posterior y los experimentos de competencia con el anticuerpo.

Las células CHO-TREx-LOX1 transfectadas se sembraron en placas de ensayo con una densidad de 7000 células/pocillo (100 µL/pocillo en medio + 10% de FCS (exento de tetraciclina)) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C, 5% de CO₂. El día siguiente se añadió doxiciclina con una concentración final de 50 ng/mL por pocillo con el fin de inducir la expresión de LOX y las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C en una atmósfera de O₂/5% de CO₂. Para cada experimento de cribado, se prepararon tres placas independientes y los anticuerpos contra LOX se aplicaron por triplicado, con una réplica por placa. El día siguiente, se prepararon los anticuerpos contra LOX1 diluyendo en serie los anticuerpos en medio de cultivo celular caliente en forma de soluciones concentradas 2x en una placa de dilución independiente. Se eliminó todo el medio de las placas de ensayo y se añadieron alícuotas de 25 µL de una serie de diluciones de los anticuerpos contra LOX1 (solución concentrada 2x) a cada pocillo de la placa de ensayo y se incubó durante 20 min a 37 °C, en una atmósfera con un 95% de O₂/5% de CO₂. Después de esto, se añadieron 25 µL por pocillo de oxLDL (con una concentración final fija de 25 µg/mL) y las placas se incubaron durante 60 min a 37 °C en un 95% de O₂/5% de CO₂.

A continuación, los pocillos se lavaron cuidadosamente con 1 x 100 µL de HBSS/Ca/Mg caliente y posteriormente se añadieron 50 µL/pocillo de carboxi-H₂DCFDA (1.5 µM en HBSS/Ca/Mg caliente) y las placas de ensayo se incubaron durante 30 min. Durante los últimos 5 min de incubación con carboxi-H₂DCFDA, se sometieron a una tinción de contraste

con tinte Hoechst (concentración final de 8.3 µg/mL) en HBSS/Ca/Mg caliente, añadiendo 10 µL de Hoechst de 50 µg/mL en HBSS/Ca/Mg caliente al carboxi-H₂DCFDA que está presente en los pasillos.

5 A continuación, se lavaron las placas de ensayo 2x con HBSS + Ca/Mg caliente y se leyeron inmediatamente en un lector de placas ultrarrápido Arrayscan (ThermoFischerScientific, Cellomics) utilizando los parámetros XF53-Hoechst (Ch1) y XF53-FITC (Ch2). Para el
10 análisis de las imágenes, se utilizó el Algoritmo de Compartmental BioApplication y la fluorescencia generada por la sonda ROS se cuantificó mediante el parámetro CircSpotAvgIntensity. Los datos competitivos y las CI50 resultantes se representaron gráficamente y se calcularon en
15 ExcelFit v.5.1 utilizando un modelo un-sitio-cero de dosis-respuesta sigmoideo utilizando un modelo logístico de 4 parámetros (Modelo 903).

ENSAYO 6 - Ensayos ELISA con especificidad por LOX1

Se realizaron ensayos ELISA con especificidad por IgG
20 esencialmente de la siguiente manera en LOX1 y las moléculas relacionadas con LOX1 que se enumeran a continuación en la Tabla 9. Las placas MAXISORB™ (NUNC) se recubrieron con 5 µg/mL de antígeno en PBS, excepto los 10 µg/mL que se utilizaron con SR-B3 humano, y se incubaron durante toda la
25 noche a 4 °C. Las placas se lavaron 3x con PBS y se bloquearon con 200 µL/pocillo de tampón de bloqueo (PBS + 3% de leche en polvo) durante 1 h. Después de que las placas se lavaron 3x con PBS, se diluyeron las IgG hasta 0.2 µg/mL en tampón de bloqueo, se añadieron 50 µL/pocillo y 1 se
30 incubaron durante 1 h. A continuación, las placas se lavaron 3x con PBS-Tween, se añadió el reactivo de detección

(anticuerpo contra la cadena ligera λ (Sigma A5175, diluido hasta 0.23 $\mu\text{g/mL}$) o la cadena ligera κ (Sigma A7164, diluido hasta 0.8 $\mu\text{g/mL}$) de la IgG humana conjugado con peroxidasa) (50 $\mu\text{L/pocillo}$ en tampón de bloqueo) y las placas se incubaron durante 1 h. Las placas se lavaron 3x con PBS-Tween, se añadieron 50 $\mu\text{L/pocillo}$ de TMB y se permitió que las placas se desarrollan durante 5-15 min. La reacción se desactivó con 50 $\mu\text{L/pocillo}$ de H_2SO_4 0.1 M y las placas se leyeron en un lector de placas ENVISION™, o un aparato similar, a 450 nm.

Tabla 9. Reactivos utilizados en los ensayos ELISA con especificidad por LOX1

Reactivo	Proveedor	Catálogo
LOX1 humano marcado con HisFlag	MedImmune	N/D
CLEC-7A humano (Dectina-1)	R&D Systems	1859-DC
CLEC-1A humano	R&D Systems	1704-CL
CLEC-4L humano (DC-SIGN)	R&D Systems	161-DC
CLEC-1B humano (CLEC-2)	R&D Systems	1718-CL
SR-A1 humano (MSR)	R&D Systems	2708-MS
SR-B3 humano (CD36)	R&D Systems	1955-CD

ENSAYO 7 - Competencia por el epítipo

Se marcaron LOX514 y LOX696 con DyLight 649 tal como se ha descrito anteriormente en la sección de las modificaciones de las proteínas y se utilizaron como moléculas competidoras para la obtención del perfil y el cribado ultrarrápido junto con los ensayos de unión al ligando. Se utilizaron los anticuerpos marcados con varias concentraciones por encima de su concentración de K_D respectiva para que fuera más

difícil que los anticuerpos no marcados con una afinidad elevada compitieran contra ellos.

Determinación de la K_D de LOX514 y LOX696 marcados con DyLight 649

5 Se diluyeron 1:50 anticuerpos contra LOX1 humano marcados con DyLight 649 en HBSS y se realizó una titulación en una placa de 384 pocillos utilizando una dilución en serie 1+1 en 16 puntos por triplicado. Para la determinación de la unión total, se añadieron 10 μ L de HBSS a todos los pocillos
10 y después se añadieron 10 μ L de células CHO TREX transfectadas con LOX1 humano (4000 células por pocillo)). Para la determinación de la unión no específica, se reemplazaron 10 μ L de HBSS por 10 μ L de anticuerpo contra LOX1 humano no marcado (1 mg/mL).

15 La placa de ensayo se incubó durante 1 h a temperatura ambiente.

Tras la incubación, se leyeron las placas en un sistema de detección celular 8200 de Applied Biosystems (lector de placas FMAT) utilizando una configuración PMT1 de 442 con un
20 recuento mínimo fijado en 10; color < 4 y FL1 < 5600.

Se determinó la unión específica sustrayendo la señal de unión total media de la señal de unión no específica media y representando gráficamente la isoterma de unión resultante con un software Prism Graphpad utilizando un algoritmo de
25 unión específico de un sitio. Se utilizaron los anticuerpos en múltiplos de la concentración de K_D calculada.

Tabla 10. Concentraciones madre para los ensayos de competencia por el epítipo de LOX514 y LOX696

Condiciones del ensayo para los ensayos de HTS y la CI_{50}

	K_D	Concentración final del ensayo (xK_D)
5	LOX10514 marcado con DyLight 649	0.8 nM 6.5 nM (x8)
	LOX10696 marcado con DyLight 649	3.3 nM 20.8 nM (x6.3)
10	Células CHO TREX transfectadas con LOX1 humano	4x10 ⁵ células/mL 4000 células por pocillo
	Material peri-prep para HTS (ensayo de unión con oxLDL)	100 % 30 %
15	Muestras de scFv/IgG purificadas para el análisis de la CI₅₀	Dilución en serie 1+1 de proteínas purificadas en 24 puntos 30%

EJEMPLO 11 - Efectos de los anticuerpos contra LOX1 en la captación lipídica, señalización celular y homeostasis del óxido nítrico endoteliales en cultivos tisulares y en vasos sanguíneos humanos

El receptor LOX1 es una de las causas inmediatas del proceso aterogénico debido a la unión específica y la internalización de oxLDL con la posterior activación de múltiples cascadas de la transducción de señales intracelulares. Remítase, por ejemplo, a Twigg *et al.*, *Cardiol Res Pract.* 2012:632408 (2012). La activación del receptor LOX1 en las células endoteliales contribuye a la disfunción endotelial, incluida una mayor producción de ROS y una alteración de la señalización del óxido nítrico (NO),

inducida en parte por el aumento de la arginasa 2. Remítase, por ejemplo, a Ryoo *et al.*, *Atherosclerosis* 214(2):279-287 (2011), Ryoo *et al.*, *Circ Res.* 102(8):923-932 (2008); y Ryoo *et al.*, *Circ Res.* 99(9):951-60 (2006). Además, la activación del receptor LOX1 conlleva el inicio y la perpetuación de un proceso inflamatorio en la pared vascular con una mayor producción de citocinas y expresión de moléculas de adhesión. Por lo tanto, el desarrollo de un inhibidor biológico del receptor LOX1 sería probablemente una manera eficaz de atenuar el desarrollo del proceso aterogénico. En la presente, los autores demuestran que LX5140110 bloquea la captación de oxLDL por parte de las células endoteliales aórticas humanas (HAEC) de una manera dependiente de la dosis. Además, LX5140110 previene la activación de la arginasa 2, un proceso que se ha demostrado previamente que es dependiente de LOX1. Es más, LX5140110 previene un descenso dependiente de ox-LDL de la producción de NO y un aumento de la producción de superóxido (ROS). Además, utilizando un constructo indicador con luciferasa NFkB, los autores demuestran que LX5140110 atenúa de manera significativa la activación de NFkB, un regulador de la inflamación clave en la aterogénesis. Remítase a, por ejemplo, Pamukcu *et al.*, *Thrombosis Res.* 128(2):117-23 (2011). Finalmente, el anticuerpo LX5140110 previene la fosforilación y la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK), un proceso crucial en la función de barrera de las células endoteliales. Por lo tanto, los autores muestran que LX5140110 bloquea varios procesos dependientes de LOX1 que conllevan la activación del endotelio e inician y estimulan la aterogénesis. Los resultados de sus experimentos se analizan a su vez.

A. LX5140110 bloquea la captación de OxLDL en las HAEC (Figura 9A)

Métodos:

Conjugación de oxLDL con Alexa Fluor-568

5 Se marcaron 500 µL de LDL oxidada humana (1 mg/mL, Intracel, Frederick, Maryland) con Alexafluor-568 utilizando el kit de marcaje de proteínas con Alexafluor-568 (Molecular probes, Eugene, Oregon) siguiendo el protocolo del fabricante. Resumiendo, se incubó oxLDL con Alexafluor-568
10 en bicarbonato 0.1 M (pH 8.3) a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se purificó la oxLDL conjugada con Alexafluor-568 con una columna de purificación con resina.

Captación de oxLDL conjugada con Alexa Fluor-568 por parte de las HAEC

15 Se sembraron HAEC en cubreobjetos recubiertos con fibronectina (10 µg/mL) durante ocho horas en medio que contenía suero antes de restringir el suero durante 18 h.

A continuación, las células se incubaron con LX5140110 ("514") 0, 0.5, 1, 5 o 10 nM o anticuerpo de control NIP
20 10 nM durante una hora en medio exento de suero. El anticuerpo se eliminó completamente con lavados con medio exento de suero fresco antes de añadir aproximadamente 50 ng/mL de AlexaFluor568-OxLDL al medio durante una hora para la captación. A continuación, se permeabilizaron las
25 células durante 2 min con un 0.5% de Triton X-100 (Fisher Scientific) en paraformaldehído al 3% (Sigma) y después se fijaron con paraformaldehído al 3% durante 20 min. Las células fijadas se marcaron con faloidina con fluoresceína (Life Technologies, Grand Island, NY) y DAPI (Life
30 Technologies) y se observaron con un microscopio TE-200 epifluorescente de Nikon. Las imágenes se capturaron con una

cámara Rolera EMCCD (QImaging, Vancouver, Canadá) con software Volocity (PerkinElmer, Lexington, MA). Las imágenes se analizaron adicionalmente con el software Volocity contando las partículas fluorescentes rojas de oxLDL conjugadas con Alexafluor-568 (se excluyen las partículas con un tamaño inferior a $0.1 \mu\text{m}^2$) dentro de las células HAEC (imágenes que no se muestran). Se adquirieron y analizaron aproximadamente 12 imágenes para cada conjunto para determinar el número promedio de partículas fluorescentes rojas de OxLDL conjugadas con Alexafluor-568 en cada célula. Los datos de la dosis-respuesta se muestran en la Figura 9A (número de vesículas por célula con la desviación estándar). Tal como se muestra en la Figura 9A, LX5140110 5 nM o 10 nM inhibe significativamente la captación de oxLDL por parte de las HAEC ($p = 0.0003$ o $p = 0.0002$, respectivamente).

B. LX5140110 atenúa la señalización de NFκB en las HAEC (Figura 9B)

Métodos: Las placas de 6 pocillos de HAEC confluentes que coexpresaban NFκB-LUCIFERASA y el gen GFP se sometieron a una restricción de suero durante 24 h antes de someterlas a las siguientes condiciones (los números hacen referencia a las barras de la Figura 9B, de izquierda a derecha): 1. Control; 2. solo oxLDL (50 $\mu\text{g/mL}$); 3. OxLDL + LX5140110 ("514") (10 nM); 4. OxLDL + NIP (anticuerpo de control) (10 nM).

Se añadieron los anticuerpos 1 h antes de oxLDL (50 $\mu\text{g/mL}$). La incubación con oxLDL se prolongó durante 8 h más. Las células se lisaron y se sometieron al ensayo de actividad de la luciferasa (Promega), y se determinó la luminiscencia con un lector de microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices). Resumiendo, las HAEC se lisaron con

tampón de lisis 5x de Promega y los sobrenadantes se colocaron en placas blancas que contenían 50 µL de sustrato de Promega en cada pocillo. 48 h después de la transfección, las células se lisaron en tampón de lisis modificado enfriado con hielo constituido por Tris-HCl 20mM a pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 1% de NP40, 1% de desoxicolato de sodio, Na₃VO₄ 1 mM, pirofosfato de sodio 2.5 mM, β-glicerofosfato 1 mM, leupeptina 1 µg/mL y cóctel de inhibidor de proteasas diluido 1:1000 (Sigma). Se añadió tampón de carga hasta una concentración final de 2x, se calentó hasta ebullición durante 5 min, se centrifugó durante 3 min y se cargó en un gel. Se utilizó la fluorescencia de GFP como control de normalización. N = 5 para cada grupo; * indica P < 0.05 (comparado con el control no tratado); # indica P < 0.05 (comparado con oxLDL + ab 514 0 nM (LX5140110)). Tal como se muestra en la Figura 9B, la adición de LX5140110 10 mM, pero no de NIP (anticuerpo de control), reduce significativamente la señalización de NFκB dependiente de oxLDL en las HAEC. Esto sugiere que LX5140110 es capaz de inhibir la activación de NFκB dependiente de LOX1, una ruta de señalización que se sabe que es posterior al receptor LOX1. Remítase a, por ejemplo, Zhao W, *et al.*, "Lipopolysaccharide induced LOX-1 expression via TLR4/MyD88/ROS activated p38MAPK-NF-κB pathway." *Vascul Pharmacol.* (2014).

C. LX5140110 inhibe la activación de la arginasa en las HAEC (Figura 9C)

Métodos: Las placas de 6 pocillos de HAEC confluentes se sometieron a una restricción de suero durante 24 h antes de someterlas a las siguientes condiciones (los números hacen referencia a las barras de la Figura 9C, de izquierda a

derecha): 1. Control; 2. OxLDL (50 µg/mL); 3. OxLDL + LX5140110 ("514") (1 nM); 4. OxLDL + LX5140110 ("514") (3 nM); 5. OxLDL + LX5140110 ("514") (10 nM); 6. OxLDL + NIP (10 nM). Los anticuerpos se añadieron 1 h antes de que las HAEC se incubaran con oxLDL (50 µg/mL) durante otras 3 h. Las células se lisaron y se determinó la actividad arginasa utilizando el ensayo con urea, utilizando α -isonitrosopropiofenona. Resumiendo, los sobrenadantes de los lisados celulares extraídos se prepararon tras una incubación con tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 0.1 mM e inhibidores de proteasas) de 30 min a 4 °C y centrifugación de 20 min a 14 000 x g a 4 °C. A continuación, se incubaron los sobrenadantes con L-arginina 150 mM durante 1 h a 37 °C. Después de 1 h se detuvo la reacción utilizando 400 µL de una mezcla de solución ácida (H₂SO₄:H₃PO₄:H₂O 1:3:7) y a continuación se añadieron 25 µL de α -isonitrosopropiofenona al 9% (en EtOH al 100%), se calentó durante 30 min a 95 °C y se leyó después de 10 min a 540 nm. N = 3 para cada grupo; * indica P < 0.05 en comparación con los controles no tratados; # indica que P < 0.05 en comparación con ab 514 0 nM (LX5140110). Tal como se muestra en la Figura 9C, la adición de LX5140110 3 nM o 10 nM, pero no de NIP 10 nM (anticuerpo de control), redujo significativamente la actividad arginasa dependiente de oxLDL en las HAEC de una manera dependiente de la dosis. Esto sugiere además que LX514110 inhibe la activación de la arginasa 2 dependiente de LOX1, una ruta de señalización posterior de la que se ha demostrado recientemente que está acoplada a LOX-1 en el endotelio vascular. Remítase a, por ejemplo, Ryoo *et al.*, *Atherosclerosis* 214:279-87 (2011).

D. LX5140110 Bloquea la reducción de la producción de óxido nítrico dependiente de OxLDL (Figura 9D)

Métodos: Se determinó la producción de NO utilizando fluorescencia de DAF. Resumiendo, para medir el NO, se colocaron las células HAEC en placas blancas de 96 pocillos (ThermoLabsystems) con una densidad de aproximadamente 5×10^4 células por pocillo y se sometieron a una restricción de suero (1% de suero) durante toda la noche. Las células estudiaron en 7 grupos experimentales (los números hacen referencia a las barras de la Figura 9D, de izquierda a derecha): <1%* Control; 2. OxLDL (50 $\mu\text{g/mL}$); 3. OxLDL + LX5140110 ("514") (0.5 nM); 4. OxLDL + LX5140110 ("514") (1 nM); 5. OxLDL + LX5140110 ("514") (5 nM); 6. OxLDL + LX5140110 ("514") (10 nM); 7. OxLDL + NIP (10 nM). Los anticuerpos se añadieron 1 h antes de que las HAEC se incubaran con oxLDL (50 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h. A continuación, se eliminó el medio y las células se colocaron a 37 °C en medio EBM2 que contenía DAF-FM DA (5 μM) durante 30 min a 37 °C. A continuación, se reemplazó el medio por medio fresco y las células se incubaron durante otros 20 min antes de medir la fluorescencia total con un lector de microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices) con una excitación de 495 nm y una emisión a 515 nm. Para confirmar que la eNOS produjo NO, se utilizó el inhibidor de la NOS L-NAME como un control (datos que no se muestran). N = 5 para cada grupo; * indica que $P < 0.05$ (comparado con el control no tratado). Tal como se muestra en la Figura 9D, la adición de LX5140110 5 nM o 10 nM, pero no de NIP 10 nM (anticuerpo de control), inhibió significativamente de una manera dependiente de la dosis la reducción dependiente de oxLDL de la producción de óxido nítrico de las HAEC.

E. LX5140110 Bloquea los aumentos dependientes de OxLDL de la producción de ROS (Figuras 9E y 9F)

Métodos: Se determina la producción de superóxido utilizando el análogo de Luminol L-012. Para medir el superóxido (ROS), se colocaron las células HAEC en placas blancas de 96 pocillos tratadas para cultivo tisular (ThermoLabsystems) con una densidad de aproximadamente 5×10^4 células por pocillo y se sometieron a una restricción de suero (1% de suero) durante toda la noche. Las 7 poblaciones de estudio fueron las siguientes (los números hacen referencia a las barras de la Figura 9E, de izquierda a derecha): 1). Control; 2. OxLDL (50 $\mu\text{g/mL}$); 3. OxLDL + LX5140110 ("514") (0.5 nM); 4. OxLDL + LX5140110 ("514") (1 nM); 5. OxLDL + LX5140110 ("514") (5 nM); 6. OxLDL + LX5140110 ("514") (10 nM); 7. OxLDL + NIP (10 nM). Los anticuerpos se añadieron 1 h antes de que las HAEC se incubaran con oxLDL (50 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h. A continuación, se eliminó el medio y las células se incubaron además a 37 °C en fenol exento de DMEM (Sigma) que contenía una concentración de 400 μM del análogo de luminol L-012 (Wako) durante 20 min como mínimo antes de añadir los agonistas. Se cuantificó la luminiscencia con el tiempo utilizando un lector de microplacas FlexStation 3 (Molecular Devices). Se confirmó la especificidad de L-012 por las especies reactivas del oxígeno coincubando con el depurador de superóxido SOD (5 mM) y esto generó unos niveles virtualmente indetectables de luminiscencia en las condiciones de control o estimuladas por oxLDL (remítase a la Figura 9F). Las unidades de luz relativas (RLU) cuantificadas a partir de la luminiscencia de L-012 indican cambios en la producción de superóxido. Para confirmar que la eNOS produjo superóxido, se utilizó el

inhibidor de la NOS L-NAME como un control. N = 5 para cada grupo. Tal como se muestra en las Figuras 9E y 9F, la adición de LX5140110 0.5 nM, 1 nM, 5 nM o 10 nM, pero no de NIP 10 nM (anticuerpo de control), inhibió la producción de ROS dependiente de oxLDL en las HAEC. Por lo tanto, LX5140110 previene el desacoplamiento de la eNOS mediado por oxLDL y el posterior aumento de la producción de ROS previniendo la activación de LOX-1 y la posterior activación de la arginasa 2. Remítase a, por ejemplo, Ryoo *et al.*, *Atherosclerosis* 214:279-87 (2011).

F. LX5140110 Bloquea la fosforilación mediada por OxDL de la cinasa de adhesión focal (FAK), Y397 (Figuras 9G y 9H).

Métodos: Se cultivaron las HAEC en medio ECM (ScienCell, Carlsbad, CA) con un 5% de suero durante un día antes de someterlas a una restricción de suero durante 18 h. A continuación, se añadió a las células LX5140110 un anticuerpo de control NIP con la concentración indicada en la Figura 9G y se incubó durante una hora. Las células se lavaron con medio fresco para eliminar los anticuerpos antes de incubarlas con 50 µg/mL de oxLDL durante una hora. Las células se lavaron con tampón PBS enfriado con hielo y a continuación se extrajo la proteína utilizando el tampón RIPA modificado (0.1% de DOC, 0.1% de Triton X-100, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM, vanadato de sodio 2 mM, 20 mg/mL de leupeptina y 20 mg/mL de aprotinina en PBS). Los lisados celulares se clarificaron por centrifugación a 15 000 x g a 4 °C durante 10 min. A continuación, se cuantificó la concentración de proteína mediante el ensayo con ácido bicinonínico (Pierce, Rockford, IL). Se mezclaron 10 µg de lisados proteicos con tampón de muestra 2X Laemmli, se

calentaron a ebullición, después se sometieron a SDS-PAGE utilizando geles de poliacrilamida con un gradiente de un 4-15% y finalmente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para la inmunoelectrotransferencia.

5 Los anticuerpos primarios utilizados en los experimentos descritos en las Figuras 9G y 9H incluyen anticuerpos contra pY397-FAK (policlonal de conejo, Life Technologies, Grand Island, NY) y contra GAPDH (monoclonal de ratón, Novus Biologicals, Littleton, CO). Se obtuvieron
10 los anticuerpos secundarios contra ratón y contra conejo conjugados con la peroxidasa de rábano picante de ICN Biochemicals, Inc. (Costa, Mesa, CA).

Se utilizó una prueba de la t de Student para analizar las diferencias en la fosforilación de FAK en Tyr397, en las
15 células de control, tratadas con oxLDL y preincubadas con anticuerpo. En la Figura 9H se suministran los valores P y la significación (*) se consideró que está presente con valores de p inferiores a 0.05 para todos los datos. Las figuras incluyen las barras del error estándar. En la **Figura**
20 **9G** se muestra una transferencia representativa en la que se aprecian los cambios en la fosforilación de FAK en Tyr397 y la expresión de GAPDH en las HAEC, mientras que en la **Figura 9H** se muestra la cuantificación del incremento porcentual de la fosforilación de FAK en Tyr397 (pY397-FAK) normalizado
25 respecto a la expresión de GAPDH. Con estos resultados se demuestra que la adición de LX5140110 5 nM o 10 nM, pero no de NIP 10 nM (anticuerpo de control), inhibió significativamente la fosforilación de FAK mediada dependiente de oxLDL en Tyr397 en las HAEC. * indica que
30 $P < 0.05$ (comparado con el control no tratado); # indica que $P < 0.05$ comparado con LX5140110 (514) 0 nM. Este dato

sugiere que LX5140110 inhibe la inducción mediada por oxLDL de la fosforilación de FAK dependiente de LOX-1, un proceso que regula las funciones citoesqueléticas endoteliales incluida la adhesión celular-célula y célula-matriz con efectos posteriores en la función de barrera endotelial.

G. LOX1 es el receptor primario responsable de la señalización de oxLDL en las HAEC (Figuras 9I, 9J y 9K).

Métodos: Generación de adenovirus de ARNhc de LOX1:

Se generaron virus que codificaban Ad-hcNodirigido y Ad-LOX1hc utilizando un kit pAdBLOCK-iT (Life Sciences). Resumiendo, se diseñaron oligonucleótidos que no estuvieron dirigidos y otros dirigidos a la región 5'UTR de LOX1 humano con un software patentado de Life Sciences y se clonaron en pU6-ENTR. Las secuencias utilizadas fueron las siguientes.

No dirigidas: Parte superior, 5'-CAC CGA TGG ATT GCA CGC AGG TTC TCG AAA GAA CCT GCG TGC AAT CCA TC-3' (SEQ ID NO:79); Parte inferior, 5'-AAA AGA TGG ATT GCA CGC AGG TTC TTT CGA GAA CCT GCG TGC AAT CCA TC-3' (SEQ ID NO:80). LOX1hc: Parte superior, 5'-CAC CGC TTC ACT CTC TCA TTC TTA GCG AAC TAA GAA TGA GAG AGT GAA GC-3' (SEQ ID NO:81); Parte inferior, 5'-AAA AGC TTC ACT CTC TCA TTC TTA GTT CGC TAA GAA TGA GAG AGT GAA GC -3' (SEQ ID NO:82).

Los plásmidos resultantes pU6-hc-Nodirigido y pU6-ARNhcLOX1 se estudiaron para determinar su función en experimentos de transfección transitoria con células HAEC. Los constructos que mostraron la mayor inhibición se recombinaron con pAD/BLOCK-iTDEST (Invitrogen) para generar pAd-Nodirigido y Ad-LOX1hc. Los virus se amplificaron, purificaron y concentraron utilizando un kit de Millipore.

Para confirmar que LOX1 es necesario para la señalización de oxLDL en las HAEC, se inhibió la expresión

del ARN de LOX1 utilizando un vector viral que expresa ARN horquillados cortos interferentes (ARNhc) dirigidos a la región 5'UTR del gen LOX1 humano (LOX1ARNhc). Resumiendo, se transdujeron HAEC confluentes en un 60% con una MOI (siglas en inglés de multiplicidad de la infección, una medida de la virulencia) de 25 de adenovirus que expresan LOX1ARNhc ("LOX1-ARNhc" o "Ad-LOX-ARNhc1"). 24 h más tarde, se reemplazó el medio con medio con poco suero (1%) que contenía virus que codifican NFkB-LUC. El día después de la transducción viral, las células se trataron con 50 µg/mL de oxLDL, se incubaron durante 8 h más y después se midió la actividad luciferasa mediante quimioluminiscencia. A continuación, se sometieron los lisados celulares a inmunotransferencia con anticuerpos contra Lox-1 o contra GAPDH. Tal como se muestra en las Figuras 9J y 9K, la adición de LOX1ARNhc redujo significativamente la expresión proteica (remítase, por ejemplo, al carril 3 de la Figura 9J en comparación con los carriles 1 y 2) lo que confirma que LOX1ARNhc inhibió de manera eficaz la expresión de LOX1 en las HAEC. Además, tal como se muestra en la Figura 9I, AdLOX1hc inhibió significativamente la señalización de NFkB mediada por oxLDL en las HACE en comparación con células incubadas con OxLDL y un control, constructo de ARNhc no dirigido (Ad-NDhc). * indica $P < 0.05$ (comparado con el control no tratado); # indica $P < 0.05$ comparado con OxLDL + Ad-NDhc.

En la Figura 10, se muestra un resumen de las rutas de señalización que participan en la señalización del receptor LOX1 y bloqueadas por los anticuerpos contra LOX1 divulgados en la presente (incluido, por ejemplo, LX5140110; "514 Ab").

La descripción anterior de los aspectos específicos revelará así en detalle la naturaleza general de la invención que terceros pueden, aplicando el conocimiento del experto en la técnica, modificar y/o adaptar fácilmente para diversas aplicaciones tales aspectos específicos, sin excesiva experimentación, sin apartarse del concepto general de la presente divulgación. Por tanto, se pretende que tales adaptaciones y modificaciones estén dentro del significado y abanico de equivalentes de los aspectos divulgados, basándose en el contenido y orientaciones presentados en la presente. Ha de entenderse que la fraseología o terminología de la presente tiene un fin descriptivo y no limitante, de manera que la terminología o fraseología de la presente memoria descriptiva ha de ser interpretada por el experto en la técnica a la luz del contenido y las orientaciones.

Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patente y/u otros documentos citados en la presente se incorporan a modo de referencia en su totalidad para todos los fines en la misma medida que si se indicara individualmente que cada publicación, patente, solicitud de patente y/u otro documento individual se incorporan a modo de referencia para todos los fines.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.