

Traduzione del Brevetto Europeo No. 2 707 029 concesso il 15.01.2020, domanda No. 12722044.0, depositata il 10.05.2012, dal titolo:

METODI DI TRATTAMENTO O PREVENZIONE DI DISTURBI CORRELATI AL COLESTEROLO

DESCRIZIONE

Questa domanda rivendica il beneficio di domanda provvisoria U.S. No. 61/642,363 depositata il 3 maggio 2012, domanda provvisoria U.S. No. 61/614,417 depositata il 22 marzo 2012, domanda provvisoria U.S. No. 61/595,526 depositata il 6 febbraio 2012, domanda provvisoria U.S. No. 61/562,303 depositata il 21 novembre 2011, domanda provvisoria U.S. No. 61/484,610 depositata il 10 maggio 2011.

RIFERIMENTO ALL'ELENCO DELLE SEQUENZE

La presente domanda viene depositata insieme a un elenco di sequenze in formato elettronico. L'elenco delle sequenze è fornito come file dal titolo A-1635-WO-PCT_Sequence_Listing.txt, creato il 10 maggio 2012, che presenta una dimensione di 315 KB. Le informazioni in formato elettronico dell'elenco di sequenze sono qui incorporate nella loro interezza a titolo di riferimento.

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda il trattamento o la prevenzione di disturbi correlati al colesterolo, quali ipercolesterolemia, iperlipidemia o dislipidemia, utilizzando proteine leganti l'antigene, ivi inclusi anticorpi, contro la proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9). Sono altresì descritti formulazioni farmaceutiche e metodi di produzione di dette formulazioni.

STATO DELL'ARTE

"Disturbi correlati al colesterolo" (che includono "disturbi correlati al colesterolo serico") includono qualsiasi uno o più dei seguenti: ipercolesterolemia, iperlipidemia, malattia cardiaca, sindrome metabolica, diabete, coronaropatia, ictus, malattie cardiovascolari, malattia di Alzheimer e in generale dislipidemie che possono manifestarsi, ad esempio, mediante colesterolo sierico totale elevato, LDL elevate, trigliceridi elevati, VLDL elevate e/o HDL basse. L'ipercolesterolemia è, di fatto, un fattore di rischio associato di coronaropatia (CHD) nell'uomo. L'abbassamento del colesterolo contenuto nelle lipoproteine a bassa densità (C-LDL) risulta in una riduzione del rischio cardiovascolare ed è un obiettivo principale nella farmacoterapia della CHD. Le statine (inibitori della idrossimetilglutaril coenzima A [HMG CoA] riduttasi) sono attualmente il trattamento di

scelta per l'ipercolesterolemia. Tuttavia, dati emergenti indicano che un trattamento più aggressivo dell'ipercolesterolemia è associato a un rischio minore di eventi di CHD. In più, un sottogruppo di pazienti è intollerante o non risponde adeguatamente a una terapia fondata sulle statine. Così, potrebbero essere utili nuove terapie che possano essere utilizzate da sole o in combinazione con agenti preesistenti per ridurre più efficacemente C-LDL.

È assodato che il riciclo del recettore per le lipoproteine a bassa densità presente sulla superficie delle cellule epatiche (LDLR) giochi un ruolo cruciale nel mantenimento dell'equilibrio del colesterolo cellulare e dell'intero organismo, regolando i livelli plasmatici di C-LDL. Più di recente, si è mostrato che la proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (PCSK9) giochi un ruolo importante nel riciclo e nella regolazione del LDLR. PCSK9 è un elemento della famiglia delle subtilisine delle serin-proteasi ed è espressa prevalentemente nel fegato. In seguito a secrezione, essa induce una sotto-regolazione di LDLR presente sulla superficie delle cellule epatiche mediante un meccanismo che coinvolge un legame diretto al LDLR. La sotto-regolazione del LDLR epatico a sua volta porta a livelli aumentati di C-LDL circolante. Così, PCSK9 può rappresentare un target per l'inibizione da parte di nuovi agenti terapeutici nel contesto di una ipercolesterolemia. Un forte razionale per un tale approccio è disponibile da studi in modelli preclinici e da riscontri che soggetti umani con mutazioni di perdita di funzione della PCSK9 abbiano livelli di colesterolo più bassi del normale e un'incidenza ridotta di CHD. WO 2009/026558 A1 divulga anticorpi anti-PCSK9 per uso nell'abbassare il colesterolo LDL sierico in un paziente che ne necessiti.

RIASSUNTO DI VARIE FORME DI REALIZZAZIONE

L'invenzione riguarda un anticorpo monoclonale che si lega specificamente a PCSK9, comprendente

a) una regione determinante complementarietà (CDR) di catena leggera di sequenza CDRL1 in SEQ ID NO:23, una CDRL2 di sequenza CDRL2 in SEQ ID NO:23 e una CDRL3 di sequenza CDRL3 in SEQ ID NO:23; e

una regione determinante complementarietà (CDR) di catena pesante di sequenza CDRH1 in SEQ ID NO:49, una CDRH2 di sequenza CDRH2 in SEQ ID NO:49 e una CDRH3 di sequenza CDRH3 in SEQ ID NO:49;

in cui le CDR sono definite da Cothia o AbM:

b) una regione determinante complementarietà (CDR) di catena leggera CDRL1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 158, una CDRL2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 162, una CDRL3 comprendente la sequenza

amminoacidica di SEQ ID NO: 395; e

una regione determinante complementarietà (CDR) di catena pesante CDRH1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 368, una CDRH2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 175, una CDRH3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 180;

c) una regione determinante complementarietà (CDR) di catena leggera CDRL1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 305, una CDRL2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 312, una CDRL3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 319; e

una regione determinante complementarietà (CDR) di catena pesante CDRH1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 308, una CDRH2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 320, una CDRH3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 310; o

d) una regione variabile di catena leggera che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 23 e una regione variabile di catena pesante comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 49 per uso in

(i) abbassamento del colesterolo LDL sierico in un paziente umano di almeno il 15%; e/o

(ii) trattamento o prevenzione di un disturbo correlato al colesterolo in un paziente umano che presenta un livello sierico elevato di colesterolo LDL;

comprendente la somministrazione dell'anticorpo monoclonale al paziente umano che ne necessita a una dose da 70 mg a 450 mg.

Il disturbo correlato al colesterolo secondo questo aspetto dell'invenzione può essere selezionato dal gruppo consistente di ipercolesterolemia familiare che include ipercolesterolemia familiare in eterozigosi e ipercolesterolemia familiare in omozigosi, ipercolesterolemia non familiare, lipoproteine (a) elevate, malattia cardiaca, sindrome metabolica, diabete, malattia coronarica, ictus, malattia cardiovascolare, malattia di Alzheimer, malattia arteriosa periferica, iperlipidemia e dislipidemia.

Secondo una forma di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL di detto paziente viene abbassato di una quantità selezionata dal gruppo consistente di a) almeno 30%, b) almeno 40%, c) almeno 50% e d) almeno 60%.

Secondo un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo monoclonale è somministrato a un paziente a una dose selezionata dal gruppo consistente di: a) da 70 mg a 450 mg, b) da 140 mg a 200 mg, c) da 140 mg a 180 mg, d) da 140 mg a 170 mg, e) 140 mg, f) 150 mg, g) 420 mg, h) 450 mg.

Secondo un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo monoclonale è somministrato a un paziente secondo un prospetto selezionato dal gruppo consistente di: (1) una volta alla settimana, (2) una volta ogni due settimane, (3) una volta al mese, (4) una volta a mesi alterni, (5) una volta ogni tre mesi (6) una volta ogni sei mesi e (7) una volta ogni dodici mesi.

Secondo un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo monoclonale è somministrato a un paziente secondo un prospetto selezionato dal gruppo consistente di:

- (a) da 70 mg a 420 mg somministrati una volta ogni 2 settimane (Q2W);
- (b) da 140 mg a 280 mg somministrati una volta ogni due settimane (Q2W);
- (c) almeno una quantità di 140 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W);
- (d) da 280 mg a 420 mg somministrati una volta ogni 4 settimane (Q4W); e
- (e) sino a 420 mg ogni due settimane (Q2W); e
- (f) almeno una quantità di 420 mg ogni quattro settimane (Q4W).

Secondo un'altra forma di realizzazione, la fase di somministrazione comprende la somministrazione dell'anticorpo monoclonale per via parenterale, facoltativamente in cui la fase di somministrazione comprende la somministrazione dell'anticorpo monoclonale per via endovenosa o per via sottocutanea.

Secondo un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo monoclonale è somministrato a un paziente:

- (a) a una dose da 105 mg a 280 mg per via sottocutanea una volta ogni due settimane e in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno del 30 -50% per 7-14 giorni, facoltativamente in cui la dose è 140 mg;
- (b) a una dose da 280 a 450 mg per via sottocutanea una volta al mese e in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato di almeno il 30 -50% per giorni da 21 a 31, facoltativamente in cui la dose è 420 mg.

Secondo un'altra forma di realizzazione ancora, l'anticorpo monoclonale è somministrato al paziente prima di, dopo o con almeno un altro agente ipocolesterolemizzante. Secondo un'altra forma di realizzazione, l'almeno un altro agente ipocolesterolemizzante è selezionato dal gruppo consistente di: statine, ivi inclusi, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina, acido nicotinico, acido fibrico, sequestranti degli acidi biliari, inibitore dell'assorbimento del colesterolo, agenti modificanti i lipidi, agonisti di PPAR gamma, agonisti di PPAR alfa/gamma, inibitori della squalene sintasi, inibitori di CETP, anti-ipertensivi, agenti anti-diabete, ivi inclusi solfonil uree, insulina, analoghi di GLP-1, inibitori di DDPIV, modulanti di ApoB, inibitori di MTP e/o trattamenti dell'arteriosclerosi

obliterante, oncostatina M, estrogeno, berberina e un agente terapeutico per un disturbo correlato all'immunità.

Secondo l'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato a un paziente a una dose da 70 mg a circa 450 mg, da circa 105 mg a circa 420 mg, da circa 120 mg a circa 200 mg, da circa 140 mg a circa 200 mg, da circa 140 mg a circa 180 mg o da circa 140 mg a circa 170 mg. In alcune forme di realizzazione di questo aspetto, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato a un paziente a una dose di 70 mg, di circa 105 mg, di circa 120 mg, di circa 140 mg, di circa 150 mg, di circa 160 mg, di circa 170 mg, di circa 180 mg, di circa 190 mg, di circa 200 mg, di circa 210 mg, di circa 280 mg, di circa 360 mg, di circa 420 mg o di 450 mg.

In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato a un paziente secondo un prospetto selezionato dal gruppo consistente di: (1) una volta alla settimana, (2) una volta ogni due settimane, (3) una volta al mese, (4) una volta a mesi alterni, (5) una volta ogni tre mesi (6) una volta ogni sei mesi e (7) una volta ogni dodici mesi. In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato per via parenterale. In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato per via endovenosa. In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato per via sottocutanea.

In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 comprende: una regione variabile di catena leggera che comprende una sequenza amminoacidica, SEQ ID NO: 23, e una regione variabile di catena pesante che comprende una sequenza amminoacidica, SEQ ID NO:49.

In alcuni aspetti, la presente invenzione riguarda il trattamento o la prevenzione di un disturbo correlato al colesterolo in un paziente avente un livello sierico di colesterolo LDL comprendente la somministrazione di almeno un anticorpo anti-PCSK9 al paziente che ne necessita a una dose da 70 mg a 450 mg, trattando o prevenendo in tal modo il disturbo correlato al colesterolo nel paziente. In un aspetto di questa invenzione, il disturbo correlato al colesterolo da trattare o prevenire è ipercolesterolemia familiare, ivi incluse ipercolesterolemia familiare in eterozigosi e ipercolesterolemia familiare in omozigosi, ipercolesterolemia non familiare, lipoproteine (a) elevate, malattia cardiaca, sindrome metabolica, diabete, malattia coronarica, ictus, malattia cardiovascolare, malattia di Alzheimer, malattia arteriosa periferica, iperlipidemia e dislipidemia. In alcune forme di realizzazione di questo aspetto, il livello sierico di colesterolo LDL di questo paziente è

abbassato almeno del 15%, almeno circa del 20%, almeno circa del 25%, almeno circa del 30%, almeno circa del 35%, almeno circa del 40%, almeno circa del 45%, almeno circa del 50%, almeno circa del 55%, almeno circa del 60%, almeno circa del 65%, almeno circa del 70%, almeno circa del 75%, almeno circa dell'80%, almeno circa dell'85% o almeno circa del 90% a confronto con un livello pre-dose di colesterolo LDL sierico in detto paziente.

In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato a un paziente a una dose da 70 mg a 450 mg, da circa 105 mg a circa 420 mg, da circa 120 mg a circa 200 mg, da circa 140 mg a circa 200 mg, da circa 140 mg a circa 180 mg o da circa 140 mg a circa 170.

In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato a un paziente secondo un prospetto selezionato dal gruppo consistente di: (1) una volta alla settimana, (2) una volta ogni due settimane, (3) una volta al mese, (4) una volta a mesi alterni, (5) una volta ogni tre mesi (6) una volta ogni sei mesi e (7) una volta ogni dodici mesi. In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato per via parenterale. In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato per via endovenosa. In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato per via sottocutanea.

In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 comprende: una regione variabile di catena leggera che comprende una sequenza amminoacidica, SEQ ID NO: 23, e una regione variabile di catena pesante che comprende una sequenza amminoacidica, SEQ ID NO:49.

In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato a un paziente secondo un prospetto selezionato dal gruppo consistente di: (1) una volta alla settimana, (2) una volta ogni due settimane, (3) una volta al mese, (4) una volta a mesi alterni, (5) una volta ogni tre mesi (6) una volta ogni sei mesi e (7) una volta ogni dodici mesi. In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato per via parenterale. In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato per via endovenosa. In alcune forme di realizzazione di questo aspetto dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato per via sottocutanea.

In particolari forme di realizzazione dell'invenzione, l'anticorpo anti-PCSK9 è 21B12.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-PCSK9 comprende: una regione variabile di catena leggera che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:23 e una regione

variabile di catena pesante che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:49. In una particolare forma di realizzazione, l'anticorpo anti-PCSK9 è 21B12, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato a un paziente a una dose di circa 70 mg per via sottocutanea una volta alla settimana, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 15-50% per circa 3-10 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 70 mg per via sottocutanea una volta alla settimana, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 15-50% per circa 3-10 giorni; è somministrato a un paziente a una dose da circa 70 mg a circa 280 mg per via sottocutanea una volta a settimane alterne, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 15-50% per circa 7-14 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 70 mg per via sottocutanea una volta a settimane alterne, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 15-50% per circa 7-14 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 105 mg per via sottocutanea una volta a settimane alterne, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 15-50% per circa 7-14 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 120 mg per via sottocutanea una volta a settimane alterne, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 15-50% per circa 7-14 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 140 mg per via sottocutanea una volta a settimane alterne, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 15-50% per circa 7-14 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 210 mg per via sottocutanea una volta a settimane alterne, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 15-50% per circa 7-14 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 280 mg per via sottocutanea una volta a settimane alterne, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 15-50% per circa 7-14 giorni; è somministrato a un paziente a una dose da circa 280 mg a circa 420 mg per via sottocutanea una volta ogni quattro settimane, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 15-50% per circa 21 - 31 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 280 mg per via sottocutanea una volta ogni quattro settimane, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 15-50% per circa 21 - 31 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 350 mg per via sottocutanea una volta ogni quattro settimane, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 15-50% per circa 21 - 31 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 420 mg per via sottocutanea una volta ogni quattro settimane, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato 15-

50% per circa 21 - 31 giorni.

In un'altra particolare forma di realizzazione, l'anticorpo anti-PCSK9 comprende una regione variabile di catena leggera che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:23 e una regione variabile di catena pesante che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:49 o è 21B12, l'anticorpo anti-PCSK9 è somministrato a un paziente a una dose di 70 mg per via sottocutanea una volta alla settimana, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 30-50% per circa 7-10 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 70 mg per via sottocutanea una volta a settimane alterne in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 30-50% per circa 10-14 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 105 mg per via sottocutanea una volta a settimane alterne, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 30-50% per circa 10-14 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 120 mg per via sottocutanea una volta a settimane alterne, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 30-50% per circa 10-14 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 140 mg per via sottocutanea una volta a settimane alterne, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 30-50% per circa 10-14 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 210 mg per via sottocutanea una volta a settimane alterne, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 30-50% per circa 10-14 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 280 mg per via sottocutanea una volta a settimane alterne, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 30-50% per circa 10-14 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 280 mg a circa 420 mg per via sottocutanea una volta ogni quattro settimane, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 30-50% per circa 24-28 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 280 mg per via sottocutanea una volta ogni quattro settimane, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 30-50% per circa 24-28 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 350 mg per via sottocutanea una volta ogni quattro settimane, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno circa del 30-50% per circa 24-28 giorni; è somministrato a un paziente a una dose di circa 420 mg per via sottocutanea ogni 4 settimane, in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato 30-50% per circa 24-28 giorni.

In un altro aspetto dell'invenzione, l'almeno un anticorpo anti-PCSK9 è somministrato al paziente prima di, dopo o in concomitanza con almeno un altro agente

ipocolesterolemizzante. Agenti ipocolesterolemizzanti includono statine, ivi inclusi atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina, acido nicotinico (niacina), niacina a lento rilascio (SLO-NIACIN), laropiprant (CORDAPTIVE), acido fibrico (LOPID (Gemfibrozil), TRICOR (fenofibrato)), sequestranti degli acidi biliari, quali colestiramina (QUESTRAN), colesvelam (WELCHOL), COLESTID (colestipolo)), inibitore di assorbimento del colesterolo (ZETIA (ezetimibe)), agenti modificanti i lipidi, agonisti di PPAR gamma, agonisti di PPAR alfa/gamma, inibitori della squalene sintasi, inibitori di CETP, anti-ipertensivi, agenti anti-diabete, ivi inclusi solfonil uree, insulina, analoghi di GLP-1, inibitori di DDPIV, modulanti di ApoB, inibitori di MTP e/o trattamenti dell'arteriosclerosi obliterante, oncostatina M, estrogeno, berbina e agenti terapeutici per un disturbo correlato all'immunità.

In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 70 mg a circa 420 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni 2 settimane (Q2W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 70 mg a circa 350 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni 2 settimane (Q2W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 105 mg a circa 350 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni 2 settimane (Q2W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 140 mg a circa 280 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni 2 settimane (Q2W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 250 mg a circa 480 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni 4 settimane (Q4W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 280 mg a circa 420 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni 4 settimane (Q4W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 350 mg a circa 420 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni 4 settimane (Q4W).

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 15% a confronto con un livello sierico pre-dose di colesterolo LDL. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 20%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 25%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 30%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 35%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 40%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 45%. In alcune forme di realizzazione, il livello

sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 50%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 55%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 60%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 75%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 70%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 75%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa dell'80%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa dell'85%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 90%.

In alcuni aspetti, l'invenzione comprende l'abbassamento del livello sierico di colesterolo LDL in un paziente e comprende la somministrazione a un paziente che ne necessita di una dose di almeno un anticorpo anti-PCSK9 e in cui la dose di un anticorpo anti-PCSK9 è somministrata secondo un prospetto selezionato dal gruppo consistente di: (1) almeno una quantità di circa 70 mg a settimane alterne (Q2W); (2) almeno una quantità di circa 105 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); (3) almeno una quantità di circa 140 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); (4) almeno una quantità di circa 150 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); (5) almeno una quantità di circa 280 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); e (6) almeno una quantità di circa 150 mg ogni quattro settimane (Q4W); (7) almeno una quantità di circa 160 mg ogni quattro settimane (Q4W); (8) almeno una quantità di circa 170 mg ogni quattro settimane (Q4W); (9) almeno una quantità di circa 180 mg ogni quattro settimane (Q4W); (10) almeno una quantità di circa 190 mg ogni quattro settimane (Q4W); (11) almeno una quantità di circa 200 mg ogni quattro settimane (Q4W); (12) almeno una quantità di circa 280 mg ogni quattro settimane (Q4W); (13) almeno una quantità di circa 350 mg ogni quattro settimane (Q4W); (14) almeno una quantità di circa 420 mg ogni quattro settimane (Q4W).

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 15% a confronto con un livello sierico pre-dose di colesterolo LDL. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 20%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 25%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 30%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 35%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 40%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di

colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 45%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 50%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 55%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 60%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 65%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 70%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 75%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa dell'80%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa dell'85%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 90%.

In alcuni aspetti, l'invenzione comprende l'abbassamento dei valori di PCSK9 in un paziente e comprende la somministrazione a un paziente che ne necessita di una dose di almeno un anticorpo anti-PCSK9 e in cui la dose di un anticorpo anti-PCSK9 è somministrata secondo un prospetto selezionato dal gruppo consistente di: (1) almeno una quantità di circa 70 mg a settimane alterne (Q2W); (2) almeno una quantità di circa 105 mg ogni due settimane (Q2W); (3) almeno una quantità di circa 140 mg a settimane alterne (Q2W); (4) almeno una quantità di circa 150 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); (5) almeno una quantità di circa 280 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); (6) almeno una quantità di circa 150 mg ogni quattro settimane (Q4W); (7) almeno una quantità di circa 160 mg ogni quattro settimane (Q4W); (8) almeno una quantità di circa 170 mg ogni quattro settimane (Q4W); (9) almeno una quantità di circa 180 mg ogni quattro settimane (Q4W); (10) almeno una quantità di circa 190 mg ogni quattro settimane (Q4W); (11) almeno una quantità di circa 200 mg ogni quattro settimane (Q4W); (12) almeno una quantità di circa 280 mg ogni quattro settimane (Q4W); (13) almeno una quantità di circa 350 mg ogni quattro settimane (Q4W); (14) almeno una quantità di circa 420 mg ogni quattro settimane (Q4W). In alcune forme di realizzazione, il valore sierico di PCSK9 è ridotto almeno circa del 60% a confronto con un valore sierico pre-dose di PCSK9. In alcune forme di realizzazione, il valore sierico di PCSK9 è ridotto almeno circa del 65%. In alcune forme di realizzazione, il valore sierico di PCSK9 è ridotto almeno circa del 70%. In alcune forme di realizzazione, il valore sierico di PCSK9 è ridotto almeno circa del 75%. In alcune forme di realizzazione, il valore sierico di PCSK9 è ridotto almeno circa dell'80%. In alcune forme di realizzazione, il valore sierico di PCSK9 è ridotto almeno circa dell'85%. In alcune forme di realizzazione, il valore sierico di PCSK9 è ridotto almeno circa del 90%.

In alcuni aspetti, l'invenzione comprende l'abbassamento del livello di colesterolo totale in un paziente e comprende la somministrazione a un paziente che ne necessita di una dose di almeno un anticorpo anti-PCSK9 e in cui la dose di un anticorpo anti-PCSK9 è somministrata secondo un prospetto selezionato dal gruppo consistente di: (1) almeno una quantità di circa 70 mg a settimane alterne (Q2W); (2) almeno una quantità di circa 105 mg ogni due settimane (Q2W); (3) almeno una quantità di circa 140 mg a settimane alterne (Q2W); (4) almeno una quantità di circa 150 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); (5) almeno una quantità di circa 280 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); (6) almeno una quantità di circa 150 mg ogni quattro settimane (Q4W); (7) almeno una quantità di circa 160 mg ogni quattro settimane (Q4W); (8) almeno una quantità di circa 170 mg ogni quattro settimane (Q4W); (9) almeno una quantità di circa 180 mg ogni quattro settimane (Q4W); (10) almeno una quantità di circa 190 mg ogni quattro settimane (Q4W); (11) almeno una quantità di circa 200 mg ogni quattro settimane (Q4W); (12) almeno una quantità di circa 280 mg ogni quattro settimane (Q4W); (13) almeno una quantità di circa 350 mg ogni quattro settimane (Q4W); (14) almeno una quantità di circa 420 mg ogni quattro settimane (Q4W). In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 20% a confronto con un livello pre-dose di colesterolo totale. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 25%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 30%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 35%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 40%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 45%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 50%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 55%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 60%.

In alcuni aspetti, l'invenzione comprende l'abbassamento del livello di colesterolo non-HDL in un paziente e comprende la somministrazione a un paziente che ne necessita di una dose di almeno un anticorpo anti-PCSK9 e in cui la dose di un anticorpo anti-PCSK9 è somministrata secondo un prospetto selezionato dal gruppo consistente di: (1) almeno una quantità di circa 70 mg a settimane alterne (Q2W); (2) almeno una quantità di circa 105 mg ogni due settimane (Q2W); (3) almeno una quantità di circa 140 mg a settimane alterne (Q2W); (4) almeno una quantità di circa 150 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); (5) almeno una quantità di circa 280 mg ogni due settimane o a settimane alterne

(Q2W); (6) almeno una quantità di circa 150 mg ogni quattro settimane (Q4W); (7) almeno una quantità di circa 160 mg ogni quattro settimane (Q4W); (8) almeno una quantità di circa 170 mg ogni quattro settimane (Q4W); (9) almeno una quantità di circa 180 mg ogni quattro settimane (Q4W); (10) almeno una quantità di circa 190 mg ogni quattro settimane (Q4W); (11) almeno una quantità di circa 200 mg ogni quattro settimane (Q4W); (12) almeno una quantità di circa 280 mg ogni quattro settimane (Q4W); (3) almeno una quantità di circa 350 mg ogni quattro settimane (Q4W); (14) almeno una quantità di circa 420 mg ogni quattro settimane (Q4W).

In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 30% a confronto con un livello pre-dose di colesterolo non-HDL. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 35%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 40%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 45%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 50%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 55%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 60%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 65%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 70%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 75%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa dell'80%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa dell'85%.

In alcuni aspetti, l'invenzione comprende l'abbassamento dei livelli di ApoB in un paziente e comprende la somministrazione a un paziente che ne necessita di una dose di almeno un anticorpo anti-PCSK9 e in cui la dose di un anticorpo anti-PCSK9 è somministrata secondo un prospetto selezionato dal gruppo consistente di: (1) almeno una quantità di circa 70 mg a settimane alterne (Q2W); (2) almeno una quantità di circa 105 mg ogni due settimane (Q2W); (3) almeno una quantità di circa 140 mg a settimane alterne (Q2W); (4) almeno una quantità di circa 150 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); (5) almeno una quantità di circa 280 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); (6) almeno una quantità di circa 150 mg ogni quattro settimane (Q4W); (7) almeno una quantità di circa 160 mg ogni quattro settimane (Q4W); (8) almeno una quantità di circa 170 mg ogni quattro settimane (Q4W); (9) almeno una quantità di circa 180 mg ogni quattro settimane (Q4W); (10) almeno una quantità di circa 190 mg ogni quattro settimane (Q4W); (11) almeno una

quantità di circa 200 mg ogni quattro settimane (Q4W); (12) almeno una quantità di circa 280 mg ogni quattro settimane (Q4W); (13) almeno una quantità di circa 350 mg ogni quattro settimane (Q4W); (14) almeno una quantità di circa 420 mg ogni quattro settimane (Q4W). In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 20% a confronto con un livello pre-dose di ApoB. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 25%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 30%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 35%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 40%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 45%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 50%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 55%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 60%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 65%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 70%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 75%.

In alcuni aspetti, l'invenzione comprende l'abbassamento dei livelli di lipoproteina A ("Lp(a)") in un paziente e comprende la somministrazione a un paziente che ne necessita di una dose di almeno un anticorpo anti-PCSK9 e in cui la dose di anticorpo anti-PCSK9 è somministrata secondo un prospetto selezionato dal gruppo consistente di: (1) almeno una quantità di circa 70 mg a settimane alterne (Q2W); (2) almeno una quantità di circa 105 mg ogni due settimane (Q2W); (3) almeno una quantità di circa 140 mg a settimane alterne (Q2W); (4) almeno una quantità di circa 150 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); (5) almeno una quantità di circa 280 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); (6) almeno una quantità di circa 150 mg ogni quattro settimane (Q4W); (7) almeno una quantità di circa 160 mg ogni quattro settimane (Q4W); (8) almeno una quantità di circa 170 mg ogni quattro settimane (Q4W); (9) almeno una quantità di circa 180 mg ogni quattro settimane (Q4W); (10) almeno una quantità di circa 190 mg ogni quattro settimane (Q4W); (11) almeno una quantità di circa 200 mg ogni quattro settimane (Q4W); (12) almeno una quantità di circa 280 mg ogni quattro settimane (Q4W); (13) almeno una quantità di circa 350 mg ogni quattro settimane (Q4W); (14) almeno una quantità di circa 420 mg ogni quattro settimane (Q4W).

In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 10% a confronto con un livello pre-dose di Lp(a). In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 15%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è

ridotto almeno circa del 20%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 25%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 30%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 35%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 40%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 45%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 50%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 55%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 60%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 65%.

In alcuni aspetti, l'invenzione comprende il trattamento o la prevenzione di un disturbo correlato al colesterolo in un paziente e comprende la somministrazione a un paziente che ne necessita di una dose di 70 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta alla settimana (QW). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 14 mg a circa 45 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta alla settimana. In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 14 mg a circa 35 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta alla settimana. In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 70 mg a circa 420 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni due settimane (Q2W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 70 mg a circa 350 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni due settimane (Q2W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 105 mg a circa 350 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni due settimane (Q2W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 140 mg a circa 280 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni due settimane (Q2W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 150 mg a circa 280 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni due settimane (Q2W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 150 mg a circa 200 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni due settimane (Q2W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 150 mg a circa 480 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni quattro settimane (Q4W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 150 mg a circa 200 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni quattro settimane (Q4W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 280 mg a circa 420 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni quattro settimane (Q4W). In alcune forme di realizzazione, la dose è da circa 350 mg a circa 420 mg di almeno un anticorpo anti-PCSK9 somministrato una volta ogni quattro settimane.

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 15% a confronto con un livello sierico pre-dose di colesterolo LDL. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 20%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 25%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 30%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 35%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 40%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 45%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 50%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 55%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 60%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 65%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 70%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 75%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa dell'80%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa dell'85%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 90%. In alcune forme di realizzazione, il disturbo correlato al colesterolo è ipercolesterolemia familiare in eterozigosi, ipercolesterolemia familiare in omozigosi, ipercolesterolemia non familiare, iperlipidemia o dislipidemia.

In alcuni aspetti, l'invenzione comprende il trattamento o la prevenzione di un disturbo correlato al colesterolo in un paziente e comprende la somministrazione a un paziente che ne necessita di una dose di almeno un anticorpo anti-PCSK9 e in cui la dose di un anticorpo anti-PCSK9 è somministrata secondo un prospetto selezionato dal gruppo consistente di: (1) almeno una quantità di circa 70 mg a settimane alterne (Q2W); (2) almeno una quantità di circa 105 mg ogni due settimane (Q2W); (3) almeno una quantità di circa 140 mg a settimane alterne (Q2W); (4) almeno una quantità di circa 150 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); (5) almeno una quantità di circa 280 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W); (6) almeno una quantità di circa 150 mg ogni quattro settimane (Q4W); (7) almeno una quantità di circa 160 mg ogni quattro settimane (Q4W); (8) almeno una quantità di circa 170 mg ogni quattro settimane (Q4W); (9) almeno una quantità di circa 180 mg ogni quattro settimane (Q4W); (10) almeno una quantità di circa 190 mg ogni quattro settimane

(Q4W); (11) almeno una quantità di circa 200 mg ogni quattro settimane (Q4W); (12) almeno una quantità di circa 280 mg ogni quattro settimane (Q4W); (13) almeno una quantità di circa 350 ogni quattro settimane (Q4W); (14) almeno una quantità di circa 420 mg ogni quattro settimane (Q4W).

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 15% a confronto con un livello sierico pre-dose di colesterolo LDL. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 20%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 25%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 30%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 35%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 40%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 45%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 50%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 55%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 60%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 65%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 70%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 75%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa dell'80%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa dell'85%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 90%.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-PCSK9 è 21B12.

In alcune forme di realizzazione, il disturbo correlato al colesterolo è ipercolesterolemia familiare in eterozigosi, ipercolesterolemia familiare in omozigosi, ipercolesterolemia non familiare, iperlipidemia o dislipidemia.

In alcuni aspetti, l'invenzione comprende formulazioni farmaceutiche comprendenti almeno un anticorpo anti-PCSK9, in cui detto anticorpo è 21B12.

Altre forme di realizzazione di questa invenzione saranno facilmente evidenti dalla divulgazione qui fornita.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

FIG. 1A illustra una sequenza amminoacidica della forma matura di PCSK9 dove il prodominio è sottolineato.

FIGG. 1B₁-1B₄ illustrano le sequenze amminoacidiche e di acido nucleico di PCSK9 dove il prodominio è sottolineato e la sequenza di segnale è in grassetto.

FIGG. 2A-2D sono tabelle di confronto di sequenze di varie catene leggere di varie proteine leganti l'antigene. FIG. 2C continua la sequenza iniziata in FIG. 2A. FIG. 2D continua la sequenza iniziata in FIG. 2B.

FIGG. 3A-3D sono tabelle di confronto di sequenze di varie catene pesanti di varie proteine leganti l'antigene. FIG. 3C continua la sequenza iniziata in FIG. 3A. FIG. 3D continua la sequenza iniziata in FIG. 3B.

FIGG. 3E-3JJ illustrano le sequenze amminoacidiche e di acido nucleico per i domini variabili di alcune forme di realizzazione delle proteine leganti l'antigene.

FIG. 3KK illustra le sequenze amminoacidiche per vari domini costanti.

FIGG. 3LL-3BBB illustrano le sequenze amminoacidiche e di acido nucleico per i domini variabili di alcune forme di realizzazione delle proteine leganti l'antigene.

FIGG. 3CCC-3JJJ sono tabelle di confronto di sequenze di varie catene pesanti e leggere di alcune forme di realizzazione delle proteine leganti l'antigene.

FIG. 4A è una curva di legame di una proteina legante l'antigene per PCSK9 umana.

FIG. 4B è una curva di legame di una proteina legante l'antigene per PCSK9 umana.

FIG. 4C è una curva di legame di una proteina legante l'antigene per PCSK9 di cinomolgo.

FIG. 4D è una curva di legame di una proteina legante l'antigene per PCSK9 di cinomolgo.

FIG. 4E è una curva di legame di una proteina legante l'antigene per PCSK9 di topo.

FIG. 4F è una curva di legame di una proteina legante l'antigene per PCSK9 di topo.

FIG. 5A illustra i risultati di un esperimento SDS PAGE che coinvolge PCSK9 e varie proteine leganti l'antigene, risultati che dimostrano la purezza e concentrazione relative delle proteine.

FIG. 5B e 5C illustrano grafici da saggi Biacore all'equilibrio di soluzione per 21B12.

FIG. 5D illustra il grafico della cinetica da un saggio di cattura Biacore.

FIG. 5E illustra un grafico a barre che mostra i risultati di binning per tre ABP.

FIG. 6A è una curva di inibizione della proteina legante l'antigene 31H4 IgG2 a PCSK9 in un saggio di legame PCSK9:LDLR in vitro.

FIG. 6B è una curva di inibizione della proteina legante l'antigene 31H4 IgG4 a PCSK9 in un saggio di legame PCSK9:LDLR in vitro.

FIG. 6C è una curva di inibizione della proteina legante l'antigene 21B12 IgG2 a PCSK9 in un saggio di legame PCSK9:LDLR in vitro.

FIG. 6D è una curva di inibizione della proteina legante l'antigene 21B12 IgG4 a PCSK9 in

un saggio di legame PCSK9:LDLR in vitro.

FIG. 7A è una curva di inibizione della proteina legante l'antigene 31H4 IgG2 nel saggio di captazione cellulare delle LDL che mostra l'effetto della ABP nel ridurre gli effetti bloccanti la captazione di LDL della PCSK9

FIG. 7B è una curva di inibizione della proteina legante l'antigene 31H4 IgG4 nel saggio di captazione cellulare delle LDL che mostra l'effetto della ABP nel ridurre gli effetti bloccanti la captazione di LDL della PCSK9

FIG. 7C è una curva di inibizione della proteina legante l'antigene 21B12 IgG2 nel saggio di captazione cellulare delle LDL che mostra l'effetto della ABP nel ridurre gli effetti bloccanti la captazione di LDL della PCSK9

FIG. 7D è una curva di inibizione della proteina legante l'antigene 21B12 IgG4 nel saggio di captazione cellulare delle LDL che mostra l'effetto della ABP nel ridurre gli effetti bloccanti la captazione di LDL della PCSK9

FIG. 8A è un grafico che illustra la capacità di abbassamento del colesterolo sierico nei topi della ABP 31H4, cambiamenti relativi ai topi trattati con controllo IgG (* $p < 0,01$).

FIG. 8B è un grafico che illustra la capacità di abbassamento del colesterolo sierico nei topi della ABP 31H4, cambiamenti relativi a tempo = zero ore (# $p, 0,05$).

FIG. 8C è un grafico che illustra l'effetto di ABP 31H4 su livelli di colesterolo HDL in topi C57B1/6 (* $p < 0,01$).

FIG. 8D è un grafico che illustra l'effetto di ABP 31H4 su livelli di colesterolo HDL in topi C57B1/6 (# $p < 0,05$).

FIG. 9 illustra un'analisi western blot della capacità di ABP 31H4 di potenziare la quantità di proteina LDLR nel fegato, presente dopo vari punti temporali.

FIG. 10A è un grafico che illustra la capacità di una proteina legante l'antigene 31H4 di abbassare il colesterolo sierico totale in topi di tipo selvatico, relativamente.

FIG. 10B è un grafico che illustra la capacità di una proteina legante l'antigene 31H4 di abbassare HDL in topi di tipo selvatico.

FIG. 10C è un grafico che illustra la capacità di abbassare il colesterolo sierico di varie proteine leganti l'antigene 31H4 e 16F12.

FIG. 11A illustra un protocollo iniettivo per esaminare la durata e la capacità di proteine leganti l'antigene nell'abbassare il colesterolo sierico.

FIG. 11B è un grafico che illustra i risultati del protocollo in FIG. 11A.

FIG. 12A illustra i livelli di LDLR in risposta alla combinazione di una statina e ABP 21B12 in cellule HepG2.

FIG. 12B illustra i livelli di LDLR in risposta alla combinazione di una statina e ABP 31H4 in cellule HepG2.

FIG. 12C illustra i livelli di LDLR in risposta alla combinazione di una statina e ABP 25A7.1, un anticorpo non neutralizzante (in contrasto con "25A7", un anticorpo neutralizzante) in cellule HepG2.

FIG. 12D illustra i livelli di LDLR in risposta alla combinazione di una statina e ABP 21B12 in cellule HepG2 che sovra-esprimono PCSK9.

FIG. 12E illustra i livelli di LDLR in risposta alla combinazione di una statina e ABP 31H4 in cellule HepG2 che sovra-esprimono PCSK9.

FIG. 12F illustra i livelli di LDLR in risposta alla combinazione di una statina e ABP 25A7.1, un anticorpo non neutralizzante (in contrasto con "25A7", un anticorpo neutralizzante) in cellule HepG2 che sovra-esprimono PCSK9.

FIG. 13A illustra le varie sequenze amminoacidiche di catena leggera di varie ABP per PCSK9. I punti (.) indicano nessun amminoacido.

FIG. 13B illustra un cladogramma di catene leggere per varie ABP per PCSK9.

FIG. 13C illustra le varie sequenze amminoacidiche di catena pesante di varie ABP per PCSK9. I punti (.) indicano nessun amminoacido.

FIG. 13D illustra un dendrogramma di catene pesanti per varie ABP per PCSK9.

FIG. 13E illustra un confronto fra CDR leggere e CDR pesanti e una designazione dei gruppi da cui derivare consenso.

FIG. 13F illustra le sequenze consenso per i Gruppi 1 e 2.

FIG. 13G illustra le sequenze consenso per i Gruppi 3 e 4.

FIG. 13H illustra le sequenze consenso per i Gruppi 1 e 2. I punti (.) indicavano residui identici.

FIG. 13I illustra le sequenze consenso per il Gruppo 2. I punti (.) indicavano residui identici.

FIG. 13J illustra le sequenze consenso per i Gruppi 3 e 4. I punti (.) indicavano residui identici.

FIG. 14 è un grafico che mostra la riduzione dei livelli di LDL-c in pazienti ricevanti dosi multiple di anticorpo anti-PCSK9 (21B12).

FIG. 15 è un grafico che mostra la riduzione dei livelli di LDL-c in pazienti che stanno assumendo statine a dose da bassa a moderata e alta, ricevanti dosi multiple di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12).

FIG. 16 è un grafico che mostra la riduzione dei livelli di ApoB in pazienti ricevanti dosi multiple di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12).

FIG. 17 è un grafico a barre che mostra la riduzione dei livelli di lipoproteina a ("Lp(a)") in pazienti che stanno assumendo statine a dose da bassa a moderata e alta, riceventi dosi multiple di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12).

FIG. 18 è un grafico che mostra la riduzione dei livelli di LDL-c in pazienti che presentano ipercolesterolemia familiare in eterozigosi ("HeFH") riceventi dosi multiple di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12).

FIG. 19 è un grafico che mostra la riduzione dei livelli di PCSK9 in pazienti che presentano ipercolesterolemia familiare in eterozigosi ("HeFH") riceventi dosi multiple di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12).

FIG. 20 è un grafico che mostra la riduzione dei livelli di colesterolo totale in pazienti che presentano ipercolesterolemia familiare in eterozigosi ("HeFH") riceventi dosi multiple di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12).

FIG. 21 è un grafico che mostra la riduzione dei livelli di colesterolo non-HDL in pazienti che presentano ipercolesterolemia familiare in eterozigosi ("HeFH") riceventi dosi multiple di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12).

FIG. 22 è un grafico che mostra la riduzione dei livelli di ApoB in pazienti che presentano ipercolesterolemia familiare in eterozigosi ("HeFH") riceventi dosi multiple di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12).

FIG. 23 è un grafico a barre che mostra la riduzione di lipoproteina a ("Lp(a)") in pazienti che presentano ipercolesterolemia familiare in eterozigosi ("HeFH") riceventi dosi multiple di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12).

FIG.24A è un grafico che mostra i dati aggregati riguardanti la riduzione di C-LDL in pazienti di quattro studi descritti negli Esempi 22-25 che avevano ricevuto varie dosi di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12) a settimane alterne (Q2W) su un periodo di 12 settimane.

FIG.24B è un grafico che mostra i dati aggregati riguardanti la riduzione di C-LDL in pazienti di quattro studi descritti negli Esempi 22-25 che avevano ricevuto varie dosi di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12) ogni quattro settimane (Q4W) su un periodo di 12 settimane.

FIG. 25A è un grafico a barre che mostra i dati aggregati riguardanti la riduzione di Lp(a) in pazienti di quattro studi descritti negli Esempi 22-25 che avevano ricevuto varie dosi di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12) a settimane alterne (Q2W) o ogni 4 settimane (Q4W) su un periodo di 12 settimane.

FIG. 25B è un grafico a barre che mostra i dati aggregati riguardanti la riduzione di HDL-C in pazienti di quattro studi descritti negli Esempi 22-25 che avevano ricevuto varie dosi di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12) a settimane alterne (Q2W) o ogni 4 settimane (Q4W) su

un periodo di 12 settimane.

FIG. 25C è un grafico a barre che mostra i dati aggregati riguardanti la riduzione di trigliceridi in pazienti di quattro studi descritti negli Esempi 22-25 che avevano ricevuto varie dosi di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12) a settimane alterne (Q2W) o ogni 4 settimane (Q4W) su un periodo di 12 settimane.

FIG. 25D è un grafico a barre che mostra i dati aggregati riguardanti la riduzione di C-VLDL in pazienti di quattro studi descritti negli Esempi 22-25 che avevano ricevuto varie dosi di un anticorpo anti-PCSK9 (21B12) a settimane alterne (Q2W) o ogni 4 settimane (Q4W) su un periodo di 12 settimane.

FIG. 26 è un grafico a barre che mostra la viscosità di formulazioni di anticorpo anti-PCSK9 (21B12) contenenti vari stabilizzanti/eccipienti.

FIG. 27 è un grafico che mostra che lo stabilizzante/eccipiente, prolina, possiede la capacità di abbassare la viscosità di formulazioni di anticorpo anti-PCSK9 (21B12) aventi alte concentrazioni di proteina.

FIG. 28A è un grafico che mostra la viscosità di varie concentrazioni di anticorpo anti-PCSK9, 21B12, in una formulazione comprendente acetato di sodio 10 mM e saccarosio 9% pH 5,2 a 25°C e 40°C.

Figure 28B è un grafico che mostra la viscosità di varie concentrazioni di anticorpo anti-PCSK9, 21B12, in una formulazione comprendente acetato di sodio 10 mM e saccarosio 9% pH 5,2 a 25°C e 40°C, a confronto con una formulazione comprendente acetato di sodio 10 mM, arginina 125 mM e saccarosio 3% pH 5,0 a 25°C e 40°C.

Figure 28C è un grafico che mostra la viscosità di varie concentrazioni di anticorpo anti-PCSK9, 21B12, in una formulazione comprendente acetato di sodio 10 mM e saccarosio 9% pH 5,2 a 25°C e 40°C, a confronto con una formulazione comprendente acetato di sodio 10 mM, metionina 100 mM e saccarosio 4% pH 5,0 a 25°C e 40°C.

Figura 28D è un grafico che mostra la viscosità di varie concentrazioni di anticorpo anti-PCSK9, 21B12, in una formulazione comprendente acetato di sodio 10 mM e saccarosio 9% pH 5,2 a 25°C e 40°C, a confronto con una formulazione comprendente acetato di sodio 10 mM e prolina 250 mM, pH 5,0 a 25°C e 40°C.

FIG. 29A è un grafico a barre che mostra il numero di particelle 10 µm in varie formulazioni di anticorpo anti-PCSK9 (ossia, 21B12) su un periodo di 6 mesi.

FIG. 29B è un grafico a barre che mostra il numero di particelle 25 µm in varie formulazioni di anticorpo anti-PCSK9 (ossia, 21B12) su un periodo di 6 mesi.

FIG. 30A è un grafico a barre che mostra il numero di particelle 10 µm in varie formulazioni

di anticorpo anti-PCSK9 (ossia, 11F1) su un periodo di 4 mesi.

FIG. 30B è un grafico a barre che mostra il numero di particelle 25 μm in varie formulazioni di anticorpo anti-PCSK9 (ossia, 11F1) su un periodo di 4 mesi.

FIG. 31 è un grafico che illustra la specificità di legame di 11F1 in un saggio di competizione con PCSKP, PCSK2, PCSK1 PCSK7 e furina con OD_{450} rappresentata graficamente sull'asse verticale e la concentrazione di PCSK9 ($\mu\text{g/ml}$) rappresentata graficamente sull'asse orizzontale.

FIG. 32 è un grafico che mostra la curva dose-risposta per l'inibizione del legame LDLR:D374Y PCSK9 da parte di 11F1 in un saggio di competizione con OD_{450} rappresentata graficamente sull'asse verticale e $\log [11\text{F1}]$ (pM) rappresentato sull'asse orizzontale.

FIG. 33 è un grafico che mostra la curva dose-risposta per l'inibizione del legame LDLR: WT PCSK9 da parte di 11F1 in un saggio di competizione con OD_{450} rappresentata graficamente sull'asse verticale e $\log [11\text{F1}]$ (pM) rappresentato sull'asse orizzontale.

FIG. 34 è un grafico che mostra la curva dose-risposta per la capacità di 11F1 di bloccare la riduzione mediata da D374Y PCSK9 umana della captazione delle LDL in cellule HepG2 con unità di fluorescenza relativa ($\times 10^4$) rappresentate graficamente sull'asse verticale e $\log [11\text{F1}]$ (nM) rappresentato graficamente sull'asse orizzontale.

FIG. 35 è un grafico che mostra la curva dose-risposta per la capacità di 11F1 di bloccare la riduzione mediata da PCSK9 WT umana della captazione delle LDL in cellule HepG2 con unità di fluorescenza relativa rappresentate graficamente ($\times 10^4$) sull'asse verticale e $\log [11\text{F1}]$ (nM) rappresentato graficamente sull'asse orizzontale.

FIG. 36 è un grafico a barre che illustra l'effetto di 11F1 e 8A3 sul colesterolo non-HDL sierico in topi che esprimono PCSK9 umana mediante AAV con la concentrazione sierica di C non-HDL (mg/ml) sull'asse verticale e il tempo trascorso dall'iniezione (giorni) rappresentato graficamente sull'asse orizzontale.

FIG. 37 è un grafico a barre che illustra l'effetto di 11F1 e 8A3 sul colesterolo totale sierico in topi che esprimono PCSK9 umana mediante AAV con colesterolo totale sierico (mg/ml) sull'asse verticale e il tempo trascorso dall'iniezione (giorni) rappresentato graficamente sull'asse orizzontale.

FIG. 38 è un grafico a barre che illustra l'effetto di 11F1 e 8A3 sul colesterolo HDL sierico (HDL-C) in topi che esprimono PCSK9 umana mediante AAV con HDL-C (mg/ml) sull'asse verticale e il tempo trascorso dall'iniezione (giorni) rappresentato graficamente sull'asse orizzontale.

FIG. 39 è un grafico che illustra i profili di concentrazione degli anticorpi IgG2, 8A3 e 11F1 in topi che esprimono PCSK9 umana mediante AAV con la concentrazione sierica degli anticorpi (ng/mL) rappresentata graficamente sull'asse verticale e il tempo trascorso dall'iniezione (giorni) rappresentato graficamente sull'asse orizzontale.

FIG. 40 è una tabella che riassume i parametri PK per IgG2, 11F1 e 8A3 in topi che esprimono PCSK9 mediante AAV.

FIG. 41 è un grafico che illustra l'effetto di una singola somministrazione sottocutanea di un anticorpo anti-KLH (controllo), 21B12, 8A3 e 11F1 sulla concentrazione sierica di LDL (C-LDL) in scimmie cinomolghe con C-LDL (mg/dl) rappresentato graficamente sull'asse verticale e il tempo trascorso dalla somministrazione in giorni sull'asse orizzontale.

FIG. 42 è un grafico che illustra l'effetto di una singola somministrazione sottocutanea di un anticorpo anti-KLH (controllo), 21B12, 8A3 e 11F1 sul colesterolo totale sierico in scimmie cinomolghe con la concentrazione di colesterolo totale (mg/dl) rappresentata graficamente sull'asse verticale e il tempo trascorso dalla somministrazione in giorni sull'asse orizzontale.

FIG. 43 è un grafico che illustra l'effetto di una singola somministrazione sottocutanea di un anticorpo anti-KLH (controllo), 21B12, 8A3 e 11F1 sul colesterolo HDL sierico in scimmie cinomolghe con HDL-C (mg/dl) rappresentato graficamente sull'asse verticale e il tempo trascorso dalla somministrazione in giorni sull'asse orizzontale.

FIG. 44 è un grafico che illustra l'effetto di una singola somministrazione sottocutanea di un anticorpo anti-KLH (controllo), 21B12, 8A3 e 11F1 sui trigliceridi sierici in scimmie cinomolghe con la concentrazione sierica di trigliceridi (mg/dl) rappresentata graficamente sull'asse verticale e il tempo trascorso dalla somministrazione in giorni sull'asse orizzontale.

FIG. 45 è un grafico che illustra l'effetto di una singola somministrazione sottocutanea di un anticorpo anti-KLH (controllo), 21B12, 8A3 e 11F1 sulla apolipoproteina B (ApoB) in scimmie cinomolghe con la concentrazione di APOB (mg/dl) rappresentata graficamente sull'asse verticale e il tempo trascorso dalla somministrazione in giorni sull'asse orizzontale.

FIG. 46 è un grafico che illustra i profili farmacocinetici medi per l'anticorpo anti-KLH (controllo), 21B12, 8A3 e 11F1 in scimmie cinomolghe con concentrazioni di anticorpi (ng/ml) rappresentate graficamente sull'asse verticale e il tempo trascorso dalla somministrazione in giorni sull'asse orizzontale.

FIG. 47 è una Tabella che riassume i parametri PK per l'anticorpo anti-KLH (controllo), 21B12, 8A3 e 11F1 in scimmie cinomolghe.

FIG. 48A illustra un confronto di sequenze amminoacidiche di catena leggera 8A1, 8A3 e 11F1 nonché di una sequenza consenso derivata dal confronto. Le sequenze delle CDR sono

sottolineate.

FIG. 48B illustra un confronto di sequenze amminoacidiche di catena pesante 8A1, 8A3 e 11F1 nonché di una sequenza consenso derivata dal confronto. Le sequenze delle CDR sono sottolineate.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DI TALUNE FORME DI REALIZZAZIONE ESEMPLIFICATIVE

I riferimenti a "forme di realizzazione" o "aspetti" da qui in poi riguarderanno forme di realizzazione e aspetti qui descritti o qui descritti e rivendicati.

Sono qui divulgate proteine leganti l'antigene (quali anticorpi e loro frammenti di legame funzionali) che si legano a PCSK9. In alcune forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene si legano a PCSK9 e impediscono che PCSK9 funzioni in vari modi. In alcune forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene bloccano o riducono la capacità di PCSK9 di interagire con altre sostanze. Ad esempio, in alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene si lega a PCSK9 in maniera da prevenire o ridurre la probabilità che PCSK9 si leghi a LDLR. In altre forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene si legano a PCSK9, ma non bloccano la capacità di PCSK9 di interagire con LDLR. In alcune forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene sono anticorpi monoclonali umani.

Come sarà apprezzato da un esperto del ramo, alla luce della presente divulgazione, alterare le interazioni fra PCSK9 e LDLR può indurre incremento della quantità di LDLR disponibile per il legame alle LDL, il che a sua volta induce diminuzione della quantità di LDL sieriche in un soggetto, da cui risulta una riduzione del livello sierico di colesterolo del soggetto. Come tali, proteine leganti l'antigene per PCSK9 possono essere utilizzate in vari metodi e formulazioni per il trattamento di soggetti che presentano livelli sierici elevati di colesterolo, a rischio di livelli sierici elevati di colesterolo o che potrebbero trarre beneficio da una riduzione dei loro livelli sierici di colesterolo. Così, sono altresì qui descritti vari metodi e tecniche per abbassare, mantenere o prevenire un incremento del colesterolo sierico. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene consente il legame fra PCSK9 e LDLR, ma la proteina legante l'antigene previene o riduce l'attività avversa di PCSK9 su LDLR. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene previene o riduce il legame di PCSK9 a LDLR.

Per comodità, le seguenti sezioni evidenziano in generale i vari significati dei termini qui utilizzati. In seguito a questa discussione, saranno discussi aspetti generali riguardanti proteine leganti l'antigene, a loro volta seguiti da Esempi specifici che dimostrano le proprietà di varie forme di realizzazione delle proteine leganti l'antigene e di come esse

possono essere impiegate.

Definizioni e forme di realizzazione

Deve essere inteso che sia la descrizione generale precedente che la descrizione dettagliata seguente sono a titolo puramente esemplificativo ed esplicativo e non sono restrittive dell'invenzione secondo le rivendicazioni. In questa domanda, l'uso del singolare include il plurale, se non altrimenti specificamente affermato. In questa domanda, l'uso di "o" significa "e/o", se non altrimenti affermato. Inoltre, l'uso del termine "includente" nonché di altre forme, quali "include" e "incluso", non è limitativo. Inoltre, termini quali "elemento" o "componente" abbracciano sia elementi che componenti comprendenti una unità ed elementi e componenti che comprendono più di una subunità, se non altrimenti specificamente affermato. Inoltre, l'uso del termine "porzione" può includere parte di una porzione funzionale dell'intera porzione funzionale.

I titoli delle sezioni qui utilizzati sono a fini puramente organizzativi e non devono essere concepiti come limitanti l'oggetto descritto.

Come utilizzati secondo la presente divulgazione, i termini seguenti, se non altrimenti indicato, devono essere intesi avere i seguenti significati:

Il termine "proproteina convertasi subtilisina kexina di tipo 9" o "PCSK9" si riferisce a un polipeptide, come esposto in SEQ ID NO: 1 e/o 3 o suoi frammenti nonché a polipeptidi correlati che includono, ma non in via limitativa, varianti alleliche, varianti di splicing, varianti derivative, varianti di sostituzione, varianti di delezione e/o varianti di inserzione, ivi inclusi l'aggiunta di una metionina N-terminale, polipeptidi di fusione e omologhi interspecie. In talune forme di realizzazione, un polipeptide PCSK9 include residui terminali, quali, ma non in via limitativa, residui di sequenze leader, residui di targeting, residui di metionina ammino-terminali, residui di lisina, residui tag e/o residui di proteine di fusione. A "PCSK9" ci si riferisce anche come a FH3, NARC1, HCHOLA3, proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 e convertasi 1 regolata da apoptosi neurale. Il gene PCSK9 codifica per una proteina, proproteina convertasi che appartiene alla sottofamiglia delle proteinasi K della famiglia delle subtilasi secretorie. Il termine "PCSK9" denota sia la pro-proteina che il prodotto generato in seguito ad autocatalisi della pro-proteina. Quando ci si riferisce soltanto al prodotto autocatalizzato (quale per una proteina legante l'antigene che si lega selettivamente a PCSK9 clivata), alla proteina ci si può anche riferire come a PCSK9 "matura", "clivata", "processata" o "attiva". Quando ci si riferisce soltanto alla forma inattiva, alla proteina ci si può riferire come a forma "inattiva", "pro-forma" o "non processata" di PCSK9. Il termine PCSK9, come qui utilizzato, include anche alleli esistenti

in natura, quali le mutazioni D374Y, S127R e F216L. Il termine PCSK9 abbraccia anche molecole di PCSK9 che incorporano modificazioni post-traduzionali della sequenza amminoacidica di PCSK9, quali sequenze di PCSK9 che sono state glicosilate, PEGilate, sequenze di PCSK9 da cui è stata clivata la sua sequenza di segnale, sequenza di PCSK9 da cui il suo prodominio è stato clivato dal dominio catalitico, ma non separato dal dominio catalitico (ad esempio, FIGG. 1A e 1B).

Il termine "attività di PCSK9" include qualsiasi effetto biologico di PCSK9. In talune forme di realizzazione, l'attività di PCSK9 include la capacità di PCSK9 di interagire con o legarsi a un substrato o recettore. In alcune forme di realizzazione, l'attività di PCSK9 è rappresentata dalla capacità di PCSK9 di legarsi a un recettore per le LDL (LDLR). In alcune forme di realizzazione, PCSK9 si lega a e catalizza una reazione che coinvolge LDLR. In alcune forme di realizzazione, l'attività di PCSK9 include la capacità di PCSK9 di alterare (ad esempio, ridurre) la disponibilità di LDLR. In alcune forme di realizzazione, l'attività di PCSK9 include la capacità di PCSK9 di indurre incremento della quantità di LDL in un soggetto. In alcune forme di realizzazione, l'attività di PCSK9 include la capacità di PCSK9 di indurre diminuzione della quantità di LDLR disponibile a legarsi a LDL. In alcune forme di realizzazione, "attività di PCSK9" include qualsiasi attività biologica che risulta da un segnale di PCSK9. Attività esemplificative includono, ma non in via limitativa, legame di PCSK9 a LDLR, attività enzimatica di PCSK9 che cliva LDLR o altre proteine, legame di PCSK9 a proteine differenti da LDLR che facilitano l'azione di PCSK9, alterazione da parte di PCSK9 della secrezione di APOB (Sun X-M et al, "Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolemia, Human Molecular Genetics 14: 1161-1169, 2005 e Ouguerram K et al, "Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9, Arterioscler thromb Vasc Biol. 24: 1448-1453, 2004), ruolo di PCSK9 nella rigenerazione del fegato e nella differenziazione di cellule neuronali (Seidah NG et al, "The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation" PNAS 100: 928-933, 2003) e ruolo di PCSK9 nel metabolismo epatico del glucosio (Costet et al., "Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c" J. Biol. Chem. 281(10):6211-18, 2006).

Il termine "ipercolesterolemia", come qui utilizzato, si riferisce a una condizione in cui i livelli di colesterolo sono elevati al di sopra di un livello desiderato. In alcune forme di realizzazione, questo denota che i livelli sierici di colesterolo sono elevati. In alcune forme

di realizzazione, il livello desiderato tiene conto di vari "fattori di rischio" che sono noti a un esperto del ramo (e sono qui descritti o riferiti).

Il termine "polinucleotide" o "acido nucleico" include polimeri nucleotidici sia a singolo filamento che a doppio filamento. I nucleotidi comprendenti il polinucleotide possono essere ribonucleotidi o deossiribonucleotidi o una forma modificata di un tipo o l'altro di nucleotide. Dette modificazioni includono modificazioni delle basi, quali derivati di bromouridina e inosina, modificazioni del ribosio, quale 2',3'-dideossiribosio e modificazioni del collegamento internucleotidico, quali fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilatioato, fosforaniladato e fosforoamidato.

Il termine "oligonucleotide" significa un polinucleotide che comprende 200 o meno nucleotidi. In alcune forme di realizzazione, gli oligonucleotidi presentano lunghezza da 10 a 60 basi. In altre forme di realizzazione, gli oligonucleotidi presentano lunghezza di 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o da 20 a 40 nucleotidi. Gli oligonucleotidi possono essere a singolo filamento o a doppio filamento, ad esempio per uso nella costruzione di un gene mutante. Gli oligonucleotidi possono essere oligonucleotidi senso o antisense. Un oligonucleotide può includere un tracciante, ivi inclusi un radiotracciante, un tracciante fluorescente, un tracciante aptenico o antigenico, per saggi di rilevamento. Gli oligonucleotidi possono essere utilizzati, ad esempio, come primer per PCR, primer di clonaggio o sonde di ibridazione.

"Molecola isolata di acido nucleico" significa un DNA o RNA di origine genomica, da mRNA, da cDNA o sintetica o una qualche loro combinazione, che non è associato a tutto o una porzione di un polinucleotide, in cui il polinucleotide isolato si ritrova in natura o è collegato a un polinucleotide al quale esso non è collegato in natura. Ai fini di questa divulgazione, dovrebbe essere inteso che "una molecola di acido nucleico comprendente" una particolare sequenza nucleotidica non abbraccia i cromosomi intatti. Molecole isolate di acido nucleico "comprendenti" sequenze di acido nucleico specificate possono includere, oltre alle sequenze specificate, sequenze codificanti per sino a dieci o anche sino a venti altre proteine o loro porzioni o possono includere sequenze regolatorie operativamente collegate che controllano l'espressione della regione codificante delle sequenze di acido nucleico riportate e/o possono includere sequenze di vettori.

Se non altrimenti specificato, l'estremità sulla sinistra di qualsiasi sequenza polinucleotidica a singolo filamento qui discussa è l'estremità 5'; alla direzione sulla sinistra delle sequenze polinucleotidiche a doppio filamento ci si riferisce come a direzione 5'. Alla direzione di addizione da 5' a 3' di trascritti di RNA nascenti ci si riferisce come a direzione di trascrizione; alle regioni di sequenza sul filamento di DNA aventi le stesse sequenze del

trascritto di RNA che sono 5' rispetto all'estremità 5' del trascritto di RNA ci si riferisce come a "sequenze a monte;" alle regioni di sequenza sul filamento di DNA aventi la stessa sequenza del trascritto di RNA che sono 3' rispetto all'estremità 3' del trascritto di RNA ci si riferisce come a "sequenze a valle."

Il termine "sequenza di controllo" si riferisce a una sequenza polinucleotidica che può interessare l'espressione e il processamento di sequenze codificanti alle quali essa è ligata. La natura di tali sequenze di controllo può dipendere dall'organismo ospite. In forme di realizzazione particolari, le sequenze di controllo per procarioti possono includere un promotore, un sito di legame ribosomiale e una sequenza di terminazione della trascrizione. Ad esempio, sequenze di controllo per eucarioti possono includere promotori comprendenti uno o una molteplicità di siti per fattori di trascrizione, sequenze di potenziamento della trascrizione e sequenza di terminazione della trascrizione. "Sequenze di controllo" possono includere sequenza leader e/o sequenze di partner di fusione.

Il termine "vettore" significa qualsiasi molecola o entità (ad esempio, acido nucleico, plasmide, batteriofago o virus) utilizzata per trasferire informazioni codificanti proteine in una cellula ospite.

Il termine "vettore di espressione" o "costrutto di espressione" si riferisce a un vettore adatto alla trasformazione di una cellula ospite e contiene sequenze di acido nucleico che dirigono e/o controllano (unitamente alla cellula ospite) l'espressione di una o più regioni codificanti eterologhe ad esse operativamente collegate. Un costrutto di espressione può includere, ma non in via limitativa, sequenze che interessano o controllano la trascrizione, traduzione e, se presenti introni, interessano lo splicing di RNA di una regione codificante ad esse operativamente collegata.

Come qui utilizzato, "operativamente collegato" significa che le componenti al quale il termine è applicato sono in una correlazione che consenta loro di portare a termine le loro funzioni attinenti in condizioni adatte. Ad esempio, una sequenza di controllo in un vettore che è "operativamente collegata" a una sequenza codificante per la proteina è ad essa ligata in maniera tale che l'espressione della sequenza codificante per la proteina sia ottenuta in condizioni compatibili con l'attività trascrizionale delle sequenze di controllo.

Il termine "cellula ospite" significa una cellula che è stata trasformata o è in grado di essere trasformata con una sequenza di acido nucleico ed esprime in tal modo un gene di interesse. Il termine include la progenie della cellula parentale, sia o non sia la progenie identica per morfologia o per costruzione genetica alla cellula parentale originaria, fintantoché il gene di interesse è presente.

Il termine "trasfezione" significa la captazione di DNA estraneo o esogeno da parte di una cellula e una cellula è stata "trasfettata", quando il DNA esogeno è stato introdotto all'interno della membrana cellulare. Un certo numero di tecniche di trasfezione è ben noto nell'arte ed è qui divulgato. Si vedano, ad esempio, Graham et al., 1973, *Virology* 52:456; Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, *supra*; Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; Chu et al., 1981, *Gene* 13:197. Tali tecniche possono essere utilizzate per introdurre in cellule ospiti adatte una o più porzioni funzionali di DNA esogeno.

Il termine "trasformazione" si riferisce a una modificazione delle caratteristiche genetiche di una cellula e una cellula è stata trasformata, quando essa è stata modificata per contenere nuovo DNA o RNA. Ad esempio, una cellula è trasformata, laddove essa è geneticamente modificata rispetto al suo stato naive, introducendo nuovo materiale genetico tramite trasfezione, trasduzione o altre tecniche. In seguito a trasfezione o trasduzione, il DNA trasformante può ricombinarsi con quello della cellula, integrandosi fisicamente in un cromosoma della cellula o può essere mantenuto transitoriamente come elemento episomiale senza essere replicato o può replicarsi indipendentemente come plasmide. Una cellula si considera sia stata "stabilmente trasformata", quando il DNA trasformante è replicato con la divisione della cellula.

Il termine "polipeptide" o "proteina" significa una macromolecola avente la sequenza amminoacidica di una proteina nativa, vale a dire una proteina prodotta da una cellula presente in natura e non ricombinante; oppure essa è prodotta da una cellula geneticamente ingegnerizzata o ricombinante e comprende molecole aventi la sequenza amminoacidica della proteina nativa o molecole aventi delezioni, addizioni e/o sostituzioni apportate a uno o più amminoacidi della sequenza nativa. Il termine include anche polimeri amminoacidici in cui uno o più amminoacidi sono analoghi chimici di un corrispondente amminoacido presenti in natura e polimeri. I termini "polipeptide" e "proteina" abbracciano specificamente proteine leganti l'antigene contro PCSK9, anticorpi o sequenze aventi delezioni, addizioni e/o sostituzioni apportate a uno o più amminoacidi della proteina legante l'antigene. Il termine "frammento polipeptidico" si riferisce a un polipeptide avente una delezione ammino-terminale, una delezione carbossi-terminale e/o una delezione interna a confronto con la proteina nativa di lunghezza intera. Tali frammenti possono anche contenere amminoacidi modificati a confronto con la proteina nativa. In talune forme di realizzazione, i frammenti sono di lunghezza circa da cinque a 500 amminoacidi. Ad esempio, i frammenti possono essere di lunghezza di almeno 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250,

300, 350, 400 o 450 amminoacidi. Frammenti polipeptidici utili includono frammenti immunologicamente funzionali di anticorpi, ivi inclusi domini di legame. Nel caso di un anticorpo legante PCSK9, frammenti utili includono, ma non in via limitativa, una regione CDR, un dominio variabile di catena pesante e/o leggera, una porzione di catena anticorpale o giustappunto la sua regione variabile che include due CDR e simili.

Il termine "proteina isolata da" a cui viene fatto riferimento significa che una proteina in oggetto (1) è priva di almeno alcune altre proteine con cui essa di norma si troverebbe, (2) è essenzialmente priva di altre proteine della stessa fonte, ad esempio della stessa specie, (3) è espressa da una cellula di una specie differente, (4) è stata separata da almeno circa il 50 per cento di polinucleotidi, lipidi, carboidrati o altri materiali con cui essa è associata in natura, (5) è operativamente associata (tramite interazione covalente o non covalente) con un polipeptide con cui essa non è associata in natura o (6) non esiste in natura. Tipicamente, una "proteina isolata" costituisce almeno circa il 5%, almeno circa il 10%, meno circa il 25% o almeno circa il 50% di un dato campione. DNA, cDNA, mRNA o altro RNA genomico di origine sintetica o qualsiasi loro combinazione può codificare per una tale proteina isolata. Preferibilmente, la proteina isolata è sostanzialmente priva di proteine o polipeptidi o altri contaminanti che si ritrovano nel suo ambiente naturale, che andrebbero a interferire con la ricerca in terapia, diagnostica, profilassi che la riguarda o altro uso.

Il termine "amminoacido" include il suo significato normale nell'arte.

"Variante" di un polipeptide (ad esempio, una proteina legante antigene o un anticorpo) comprende una sequenza amminoacidica, in cui uno o più residui amminoacidici siano ivi inseriti, deleti dalla e/o sostituiti nella sequenza amminoacidica relativamente a un'altra sequenza polipeptidica. Varianti includono proteine di fusione.

Il termine "identità" si riferisce a una correlazione fra le sequenze di due o più molecole polipeptidiche o due o più molecole di acido nucleico, come determinato tramite allineamento e confronto delle sequenze. "Identità percentuale" significa la percentuale di residui identici fra gli amminoacidi o i nucleotidi nelle molecole confrontate ed è calcolata sulla base della dimensione delle più piccole delle molecole che vengono confrontate. Per questi calcoli, i gap negli allineamenti (qualora presenti) sono preferibilmente affrontati mediante un particolare modello matematico programma di computer (ossia, un "algoritmo"). Metodi che possono essere utilizzati per calcolare l'identità degli acidi nucleici allineati o dei polipeptidi includono quelli descritti in Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer

Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; e Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073. Nel calcolare l'identità percentuale, le sequenze che vengono confrontate sono tipicamente allineate in una maniera che procuri la massima corrispondenza fra le sequenze. Un esempio di programma informatico che può essere utilizzato per determinare l'identità percentuale è il pacchetto del programma GCG, che include GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI). L'algoritmo informatico GAP viene utilizzato per allineare i due polipeptidi o polinucleotidi per i quali occorre determinare l'identità di sequenza percentuale. Le sequenze sono allineate per una corrispondenza ottimale del loro rispettivo amminoacido o nucleotide ("estensione corrisposta", come determinato dall'algoritmo). Una penalità per l'apertura di gap (che viene calcolata come 3x la diagonale media, in cui la "diagonale media" è la media della diagonale della matrice di confronto che viene usata; la "diagonale" è il punteggio o numero assegnato a ciascuna corrispondenza amminoacidica perfetta da parte della particolare matrice di confronto) e una penalità per l'estensione di gap (che è usualmente 1/10 volte la penalità per l'apertura di gap) nonché una matrice di confronto, quale PAM 250 o BLOSUM 62, sono utilizzate unitamente all'algoritmo. In talune forme di realizzazione, è altresì utilizzata dall'algoritmo una matrice di confronto standard (si vedano Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 per la matrice di confronto PAM 250; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 per la matrice di confronto BLOSUM 62).

Esempi di parametri che possono essere impiegati nel determinare l'identità percentuale per polipeptidi o sequenze nucleotidiche, utilizzando il programma GAP, sono i seguenti:

- Algoritmo: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453
- Matrice di confronto: BLOSUM 62 di Henikoff *et al.*, 1992, *supra*
- Penalità per gap: 12 (ma con nessuna penalità per gap finali)
- Penalità per lunghezza del gap: 4
- Soglia di similarità: 0

Taluni schemi di allineamento per allineare due sequenze amminoacidiche possono risultare nella corrispondenza di una breve regione soltanto delle due sequenze e questa piccola regione allineata può avere un'identità di sequenza molto elevata, anche se non vi è una relazione significativa fra le due sequenze di lunghezza intera. Di conseguenza, il metodo di

allineamento selezionato (programma GAP) può essere regolato, se desiderato, per conseguire un allineamento che si estenda almeno per 50 o altro numero di amminoacidi contigui del polipeptide target.

Come qui utilizzati, i venti amminoacidi convenzionali (ad esempio esistenti in natura) e loro abbreviazioni seguono l'uso convenzionale. Si veda Immunology--A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Gli stereoisomeri (ad esempio, i D-amminoacidi) dei venti amminoacidi convenzionali, amminoacidi non naturali, quali amminoacidi α -, α -bisostituiti, N-alchilamminoacidi, acido lattico e altri amminoacidi non convenzionali possono anche essere componenti adatte per i polipeptidi della presente invenzione. Esempi di amminoacidi non convenzionali includono: 4-idrossiprolina, γ -carbossiglutammato, ϵ -N,N,N-trimetillisina, ϵ -N-acetillisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmietionina, 3-metilistidina, 5-idrossilisina, σ -N-metilarginina e altri amminoacidi simili e imminoacidi (ad esempio, 4-idrossiprolina). Nella notazione di polipeptide qui utilizzata, la direzione sulla sinistra è la direzione ammino-terminale e la direzione sulla destra è la direzione carbossi-terminale, in conformità all'uso e alla convenzione standard.

In maniera analoga, se non altrimenti specificato, l'estremità sulla sinistra di sequenze polinucleotidiche a singolo filamento è l'estremità 5'; alla direzione sulla sinistra di sequenze polinucleotidiche a doppio filamento ci si riferisce come a direzione 5'. Alla direzione dell'addizione da 5' a 3' di trascritti di RNA nascenti ci si riferisce come a direzione di trascrizione; alle regioni di sequenza sul filamento di DNA aventi la stessa sequenza dell'RNA e che sono 5' rispetto all'estremità 5' del trascritto di RNA ci si riferisce come a "sequenze a monte"; alle regioni di sequenza sul filamento di DNA aventi la stessa sequenza dell'RNA e che sono 3' rispetto all'estremità 3' del trascritto di RNA ci si riferisce come a "sequenze a valle".

Sostituzioni amminoacidiche conservative possono abbracciare residui amminoacidici non esistenti in natura, che sono tipicamente incorporati mediante sintesi peptidica chimica anziché mediante sintesi in sistemi biologici. Questi includono peptidomimetici e altre forme inverse o invertite di porzioni funzionali amminoacidiche.

I residui presenti in natura possono essere suddivisi in classi in base a proprietà comuni di catena laterale:

- 1) idrofobiche: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) idrofiliche neutre: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 3) acide: Asp, Glu;

4) basiche: His, Lys, Arg;

5) residui che influenzano l'orientamento della catena: Gly, Pro; e

6) aromatiche: Trp, Tyr, Phe.

Ad esempio, sostituzioni non conservative possono implicare lo scambio di un elemento di una di queste classi con un elemento di un'altra classe. Tali residui sostituiti possono essere introdotti, ad esempio, in regioni di un anticorpo che sono omologhe ad anticorpi non umani o nelle regioni non omologhe della molecola.

Nell'apportare cambiamenti alla proteina legante l'antigene o proteina PCSK9, secondo talune forme di realizzazione, può essere considerato l'indice idropatico degli aminoacidi. A ciascun amminoacido è stato assegnato un indice idropatico sulla base delle sue idrofobicità e caratteristiche di carica. Essi sono: isoleucina (+ 4,5); valina (+ 4,2); leucina (+ 3,8); fenilalanina (+ 2,8); cisteina/cistina (+ 2,5); metionina (+ 1,9); alanina (+ 1,8); glicina (- 0,4); treonina (- 0,7); serina (- 0,8); triptofano (- 0,9); tirosina (- 1,3); prolina (- 1,6); istidina (- 3,2); glutammato (- 3,5); glutammina (- 3,5); aspartato (- 3,5); asparagina (- 3,5); lisina (- 3,9); e arginina (- 4,5).

L'importanza dell'indice idropatico amminoacidico nel conferire a una proteina una funzione biologica interattiva è generalmente intesa nell'arte. Kyte et al., J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982). Taluni amminoacidi possono essere notoriamente sostituiti da altri amminoacidi aventi un indice o punteggio idropatico simile, mantenendo un'attività biologica simile. Nel realizzare cambiamenti basati sull'indice idropatico, in talune forme di realizzazione è inclusa la sostituzione di amminoacidi i cui indici idropatici sono entro ± 2 . In talune forme di realizzazione, sono inclusi quelli che sono entro ± 1 e in talune forme di realizzazione sono inclusi quelli entro $\pm 0,5$.

È altresì inteso nell'arte che la sostituzione di amminoacidi simili può essere realizzata efficacemente in base all'idrofilità, in particolar modo laddove la proteina o il peptide biologicamente funzionale in tal modo creato/o è destinata/o all'uso in forme di realizzazione immunologiche, come nel presente caso. In talune forme di realizzazione, l'idrofilità media locale massima di una proteina, come disciplinato dall'idrofilità dei suoi amminoacidi adiacenti, si correla alla sua immunogenicità e antigenicità, ossia con una proprietà biologica della proteina.

I seguenti valori di idrofilità sono stati assegnati a questi residui amminoacidici: arginina (+ 3,0); lisina (+ 3,0); aspartato (+ 1 $\pm$ 3,0); glutammato (+ 1 $\pm$ 0,3); serina (+ 0,2); asparagina (+ 0,2); glutammina (+ 0); glicina (0,4); treonina (- 0,5); prolina (- 1 $\pm$ 0,5); alanina (- 0,5); istidina (- 1,0); cisteina (- 1,3); metionina (- 1,5); valina (- 1,8); leucina (- 1,8); isoleucina (-

2,3); tirosina (- 2,5); fenilalanina (- 3,4) e triptofano (- 3,4). Nel realizzare cambiamenti sulla base di valori di idrofilicità simili, in talune forme di realizzazione è inclusa la sostituzione di amminoacidi i cui valori di idrofilicità sono entro ± 2 , in talune forme di realizzazione sono inclusi quelli che sono entro ± 1 e in talune forme di realizzazione sono inclusi quelli entro $\pm 0,5$. È possibile anche identificare epitopi da sequenze amminoacidiche primarie sulla base dell'idrofilicità. A queste regioni ci si riferisce anche come a "regioni core epitopiche".

Sostituzioni amminoacidiche esemplificative sono espone in Tabella 1.

TABELLA 1
Sostituzioni amminoacidiche

Residui originari	Sostituzioni esemplificative	Sostituzioni preferite
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, acido 1,4 diammino-butirrico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Il termine "derivato" si riferisce a una molecola che include una modificazione chimica differente da una inserzione, delezione o sostituzione di amminoacidi (o acidi nucleici). In talune forme di realizzazione, i derivati comprendono modificazioni covalenti, ivi incluso, ma non in via limitativa, legame chimico con polimeri, lipidi o altre porzioni funzionali organiche o inorganiche. In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene chimicamente modificata può avere un'emivita di circolo maggiore di una proteina legante l'antigene che non è chimicamente modificata. In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene chimicamente modificata può avere una migliorata capacità di targeting per cellule, tessuti e/o organi desiderati. In alcune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene derivata è modificata covalentemente per includere uno o più attacchi polimerici idrosolubili, ivi inclusi, ma non in via limitativa, glicole polietilenico, glicole poliossietilenico o glicole polipropilenico. Si vedano, ad esempio, i brevetti U.S. No: 4,640,835, 4,496,689, 4,301,144, 4,670,417, 4,791,192 e 4,179,337. In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene derivata comprende uno o più polimeri ivi inclusi, ma non in via limitativa, monometossi-glicole polietilenico, destrano, cellulosa o altri polimeri a base di carboidrati, poli-(N-vinilpirrolidone)-glicole polietilenico, omopolimeri di glicole propilenico, un copolimero di ossido polipropilenico/ossido etilenico, polioli poliossietilati (ad esempio, glicerolo) e alcool polivinilico nonché miscele di tali polimeri.

In talune forme di realizzazione, un derivato è modificato covalentemente con subunità di glicole polietilenico (PEG). In talune forme di realizzazione, uno o più polimeri idrosolubili sono legati a una o più specifiche posizioni, ad esempio in corrispondenza dell'estremità ammino terminale, di un derivato. In talune forme di realizzazione, uno o più polimeri idrosolubili sono attaccati in modalità casuale a una o più catene laterali di un derivato. In talune forme di realizzazione, PEG è utilizzato per migliorare la capacità terapeutica di una proteina legante l'antigene. In talune forme di realizzazione, PEG è utilizzato per migliorare la capacità terapeutica di un anticorpo umanizzato. Taluni di tali metodi sono discussi, ad esempio, nel brevetto U.S. No. 6,133,426.

Analoghi peptidici sono comunemente utilizzati nell'industria farmaceutica come farmaci non peptidici con proprietà analoghe a quelle del peptide template. Questi tipi di composto non peptidico sono denominati "mimetici peptidi" o "peptidomimetici." Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15:29 (1986); Veber & Freidinger, TINS, p.392 (1985); e Evans et al., J. Med. Chem., 30:1229 (1987). Tali composti sono spesso sviluppati con l'aiuto del modellamento molecolare computerizzato. Mimetici peptidici che sono strutturalmente simili a peptidi utili

dal punto di vista terapeutico possono essere utilizzati per produrre un effetto terapeutico o profilattico simile. Generalmente, peptidomimetici sono strutturalmente simili a un polipeptide di paradigma (ossia, un polipeptide che possiede una proprietà biochimica o un'attività farmacologica), quale un anticorpo umano, ma possiedono uno o più collegamenti peptidici facoltativamente sostituiti da un collegamento selezionato da: $--CH_2 NH--$, $--CH_2 S--$, $--CH_2 -CH_2--$, $--CH=CH-$ (cis e trans), $--COCH_2 --$, $--CH(OH)CH_2 --$ e $--CH_2 SO--$ mediante metodi ben noti nell'arte. La sostituzione sistematica di uno o più amminoacidi di una sequenza consenso con un D-amminoacido dello stesso tipo (ad esempio, D-lisina al posto di L-lisina) può essere utilizzata in talune forme di realizzazione per generare peptidi più stabili. In più, peptidi costretti, comprendenti una sequenza consenso o una variazione di sequenza consenso sostanzialmente identica, possono essere generati mediante metodi noti nell'arte (Rizo and Gierasch, Ann. Rev. Biochem., 61:387 (1992)); ad esempio, tramite addizione di residui di cisteina interni capaci di formare ponti disolfuro intramolecolari che ciclizzano il peptide.

Il termine "esistente in natura", come utilizzato nel dispiegarsi di tutta la descrizione in connessione con materiali biologici, quali polipeptidi, acidi nucleici, cellule ospiti e simili, si riferisce a materiali che si riscontrano in natura o a una forma dei materiali che si riscontra in natura.

"Proteina legante l'antigene" ("ABP"), come qui utilizzato, significa qualsiasi proteina che si lega a uno specificato antigene target. Nella domanda corrente, l'antigene target specificato è la proteina PCSK9 o suo frammento. "Proteina legante l'antigene" include, ma non in via limitativa, anticorpi e loro parti di legame, quali frammenti immunologicamente funzionali. Peptibody sono un altro esempio di proteine leganti l'antigene. Il termine "frammento immunologicamente funzionale" (o semplicemente "frammento") di un anticorpo o catena immunoglobulinica (catena pesante o leggera), come qui utilizzato, è una specie di proteina legante l'antigene comprendente una porzione (indipendentemente da come quella porzione è ottenuta o sintetizzata) di un anticorpo che è sprovvista di almeno alcuni degli amminoacidi presenti in una catena di lunghezza intera, ma che è comunque in grado di legarsi specificamente a un antigene. Tali frammenti sono biologicamente attivi per il fatto che essi si legano all'antigene target e possono competere con altre proteine leganti l'antigene, ivi inclusi anticorpi intatti, per legarsi a un dato epitopo. In alcune forme di realizzazione, i frammenti sono frammenti neutralizzanti. In alcune forme di realizzazione, i frammenti possono bloccare o ridurre la probabilità dell'interazione fra LDLR e PCSK9. In un aspetto, tale frammento manterrà almeno una CDR nella catena leggera o pesante di

lunghezza intera e in alcune forme di realizzazione comprenderà una singola catena pesante e/o catena leggera o loro porzione. Questi frammenti biologicamente attivi possono essere prodotti mediante tecniche di DNA ricombinante o possono essere prodotti tramite clivaggio enzimatico o chimico di proteine leganti l'antigene, ivi inclusi anticorpi intatti. Frammenti immunoglobulinici immunologicamente funzionali includono, senza limitazioni, Fab, un diabody (dominio variabile di catena pesante sugli stessi polipeptidi di un dominio variabile di catena leggera, connessi tramite un linker peptidico corto che è troppo corto per permettere l'appaiamento fra i due domini sulla stessa catena), Fab', F(ab')₂, Fv, anticorpi dominio e anticorpi a singola catena e possono essere derivati da una fonte di mammifero, ivi inclusi, senza limitazioni, uomo, topo, ratto, camélide o coniglio. È ulteriormente contemplato che una porzione funzionale delle proteine leganti l'antigene qui divulgate, ad esempio una o più CDR, possa essere covalentemente legata a una seconda proteina o a una piccola molecola per creare un agente terapeutico diretto contro un target particolare nel corpo, possedendo proprietà terapeutiche bifunzionali o avendo un'emivita sierica prolungata. Come sarà apprezzato dall'esperto del ramo, una proteina legante l'antigene può includere componenti non proteiche. In alcune sezioni della presente divulgazione, esempi di ABP sono qui descritti in termini di "numero/lettera/numero" (ad esempio, 25A7). In questi casi, il nome esatto denota un anticorpo specifico. Vale a dire, una ABP denominata 25A7 non è necessariamente lo stesso di un anticorpo denominato 25A7.1, (a meno che essi non siano esplicitamente impartiti come medesimi fra loro nella specificazione, ad esempio 25A7 e 25A7.3). Come sarà apprezzato dall'esperto del ramo, in alcune forme di realizzazione LDLR non è una proteina legante l'antigene. In alcune forme di realizzazione, sottosezioni di legame di LDLR non sono proteine leganti l'antigene, ad esempio EGFa. In alcune forme di realizzazione, altre molecole attraverso cui PCSK9 attua segnali *in vivo* non sono proteine leganti l'antigene. Tali forme di realizzazione saranno esplicitamente identificate come tali. Talune proteine leganti l'antigene qui descritte sono anticorpi o sono derivate da anticorpi. In talune forme di realizzazione, la struttura polipeptidica delle proteine leganti l'antigene si basa su anticorpi, ivi inclusi, ma non in via limitativa, anticorpi monoclonali, anticorpi bispecifici, minibody, anticorpi dominio, anticorpi sintetici (a cui talvolta ci si riferisce qui come a "mimetici anticorpali"), anticorpi chimerici, anticorpi umanizzati, anticorpi umani, fusioni di anticorpi (a cui talvolta ci si riferisce qui come a "coniugati anticorpali") e loro frammenti, rispettivamente. In alcune forme di realizzazione, ABP comprende o consiste di avimeri (peptide di legame stretto). Queste varie proteine leganti l'antigene sono qui ulteriormente descritte.

Regione "Fc" comprende due frammenti di catena pesante comprendenti i domini C_{H1} e C_{H2} di un anticorpo. I due frammenti di catena pesante sono tenuti insieme da due o più legami disolfuro e tramite interazioni idrofobiche dei domini C_{H3} .

"Frammento Fab" comprende una catena leggera e il C_{H1} e le regioni variabili di una catena pesante. La catena pesante di una molecola Fab non può formare un ponte disolfuro con un'altra molecola di catena pesante.

"Frammento Fab'" comprende una catena leggera e una porzione di una catena pesante che contiene il dominio V_H e il dominio C_{H1} e anche la regione fra i domini C_{H1} e C_{H2} in maniera tale che si possa formare un legame disolfuro intercatene fra le due catene pesanti e due frammenti Fab' per formare una molecola $F(ab')_2$.

"Frammento $F(ab')_2$ " contiene due catene leggere e due catene pesanti contenenti una porzione della regione costante fra i domini C_{H1} e C_{H2} in maniera tale che si formi un legame disolfuro intercatene fra le due catene pesanti. Un frammento $F(ab')_2$ è così composto da due frammenti Fab' che sono tenuti insieme da un legame disolfuro fra le due catene pesanti.

La "regione F_v " comprende le regioni variabili di entrambe le catene pesante e leggera, ma è sprovvista delle regioni costanti.

"Anticorpi a catena singola" sono molecole F_v in cui le regioni variabili di catena pesante e leggera sono state connesse da un linker flessibile per formare una singola catena polipeptidica che forma una regione legante l'antigene. Anticorpi a catena singola sono discussi in dettaglio nella pubblicazione della domanda di brevetto internazionale No. WO 88/01649 e nei brevetti statunitensi No. 4,946,778 e No. 5,260,203.

"Anticorpo dominio" è un frammento immunoglobulinico immunologicamente funzionale, contenente soltanto la regione variabile di una catena pesante o la regione variabile di una catena leggera. In alcuni casi, due o più regioni V_H sono covalentemente unite con un linker peptidico per creare un anticorpo dominio bivalente. Le due regioni V_H di un anticorpo dominio bivalente possono mirare a medesimi o differenti antigeni target.

Una/un "proteina legante l'antigene bivalente" o "anticorpo bivalente" comprende due siti leganti l'antigene. In alcuni casi, i due siti di legame possiedono le stesse specificità antigeniche. Proteine leganti l'antigene bivalenti e anticorpi bivalenti possono essere bispecifici, si veda qui più avanti. Un anticorpo bivalente differente da un anticorpo "multispecifico" o "multifunzionale", in talune forme di realizzazione, è tipicamente inteso avere ciascuno dei suoi siti di legame identici.

Una/un "proteina legante l'antigene multispecifica" o "anticorpo multispecifico" è una/uno che mira a più di un antigene o epitopo target.

Proteina legante l'antigene o anticorpo "bispecifica/o", "duale-specifica/o" o "bifunzionale" è una proteina legante l'antigene o anticorpo ibrida/o, rispettivamente, avente due differenti siti leganti l'antigene. Le proteine leganti l'antigene e gli anticorpi bispecifici sono una specie di proteina legante l'antigene multispecifica o di anticorpo multispecifico e possono essere prodotti mediante una varietà di metodi ivi inclusi, ma non in via limitativa, la fusione di ibridomi o il collegamento di frammenti Fab'. Si veda, ad esempio, Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. I due siti di legame di una proteina legante l'antigene bispecifica o di un anticorpo bispecifico si legheranno a due differenti epitopi che possono risiedere sugli stessi o su differenti target proteici.

Una proteina legante antigene è detta "legarsi specificamente" al suo antigene target, quando la costante di dissociazione (K_d) è $\leq 10^{-7}$ M. ABP si lega specificamente a un antigene con "alta affinità", quando la K_d è $\leq 5 \times 10^{-9}$ M e con "altissima affinità", quando la K_d è $\leq 5 \times 10^{-10}$ M. In una forma di realizzazione, ABP possiede una $K_d < 10^{-9}$ M. In una forma di realizzazione, l'off-rate è $< 1 \times 10^{-5}$. In altre forme di realizzazione, le ABP si legheranno a PCSK9 umana con una K_d circa fra 10^{-9} M e 10^{-13} M e in un'altra forma di realizzazione ancora, le ABP si legheranno con una $K_d \leq 5 \times 10^{-10}$. Come sarà apprezzato dall'esperto del ramo, in alcune forme di realizzazione qualsiasi o tutti i frammenti leganti l'antigene può/possono specificamente legarsi a PCSK9.

Una proteina legante l'antigene è "selettiva", quando essa si lega a un target più strettamente di quanto si leghi a un secondo target.

"Regione legante l'antigene" significa una proteina o una porzione di una proteina che si lega specificatamente a un antigene specificato (ad esempio, un paratopo). Ad esempio, a quella porzione di proteina legante l'antigene che contiene i residui amminoacidici che interagiscono con un antigene e conferiscono alla proteina legante l'antigene la sua specificità e affinità per gli antigeni, ci si riferisce come a "regione legante l'antigene." Una regione legante l'antigene include tipicamente una o più "regioni determinanti complementarietà" ("CDR"). Talune regioni leganti l'antigene includono anche una o più regioni "framework". Una "CDR" è una sequenza amminoacidica che contribuisce alla specificità e all'affinità del legame con l'antigene. Regioni "framework" possono coadiuvare nel mantenimento di un'appropriata conformazione delle CDR per promuovere il legame fra la regione legante l'antigene e un antigene. Dal punto di vista strutturale, regioni framework possono localizzarsi negli anticorpi fra le CDR. Esempi di regioni framework e CDR sono mostrate nelle FIGG. 2A-3D, 3CCC-3JJJ. In alcune forme di realizzazione, le sequenze delle

CDR per la catena leggera dell'anticorpo 3B6 sono come segue: CDR1 TLSSGYSSYEVD (SEQ ID NO: 279); CDR2 VDTGGIVGSKGE (SEQ ID NO: 280); CDR3 GADHSGTGNFVVV (SEQ ID NO: 281) e le FR sono come segue: FR1 QPVLQPLFASASLGASVTLTC (SEQ ID NO: 282); FR2 WYQQRPGKGPRFVMR (SEQ ID NO: 283); FR3 GIPDRFSVLGSGLNRYLTIKNIQEEDESDYHC (SEQ ID NO: 284); e FR4 FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 285).

In taluni aspetti, sono fornite le proteine leganti l'antigene ricombinanti che si legano a PCSK9, ad esempio PCSK9 umana. In questo contesto, una "proteina legante l'antigene ricombinante" è una proteina realizzata, utilizzando tecniche ricombinanti, ossia attraverso l'espressione di un acido nucleico ricombinante, come qui descritto. Metodi e tecniche per la produzione di proteine ricombinanti sono ben noti nell'arte.

Il termine "anticorpo" si riferisce a una immunoglobulina intatta di qualsiasi isotipo o suo frammento che possa competere con l'anticorpo intatto per il legame specifico all'antigene target e include, ad esempio, anticorpi chimerici, umanizzati, completamente umani e bispecifici. "Anticorpo" è una specie di proteina legante l'antigene. Un anticorpo intatto comprenderà generalmente almeno due catene pesanti di lunghezza intera e due catene leggere di lunghezza intera, ma in alcuni casi potrà includere un minor numero di catene, quali anticorpi esistenti in natura nei camelidi che possono comprendere soltanto catene pesanti. Gli anticorpi possono essere derivati solamente da una fonte singola o possono essere "chimerici," vale a dire che porzioni differenti dell'anticorpo possono essere derivate da due differenti anticorpi, come qui più avanti ulteriormente descritto. Proteine leganti l'antigene, anticorpi o frammenti di legame possono essere prodotti in ibridomi tramite tecniche di DNA ricombinante o mediante clivaggio enzimatico o chimico di anticorpi intatti. Se non altrimenti indicato, il termine "anticorpo" include, oltre ad anticorpi comprendenti due catene pesanti di lunghezza intera e due catene leggere di lunghezza intera, loro derivati, varianti, frammenti e muteine, esempi dei quali sono descritti qui più avanti. Inoltre, se non esplicitamente escluso, gli anticorpi includono anticorpi monoclonali, anticorpi bispecifici, minibody, anticorpi dominio, anticorpi sintetici (a cui talvolta ci si riferisce qui come a "mimetici anticorpali"), anticorpi chimerici, anticorpi umanizzati, anticorpi umani, fusioni di anticorpi (a cui talvolta ci si riferisce qui come a "coniugati anticorpali") e loro frammenti, rispettivamente. In alcune forme di realizzazione, il termine abbraccia anche peptibody.

Unità strutturali anticorpali esistenti in natura comprendono tipicamente un tetramero. Ciascun tale tetramero è tipicamente composto da due paia identiche di catene

polipeptidiche, ciascun paio avente una catena "leggera" (in talune forme di realizzazione di circa 25 kDa) di lunghezza intera e una catena "pesante" (in talune forme di realizzazione di circa 50-70 kDa) di lunghezza intera. La porzione ammino-terminale di ciascuna catena include tipicamente una regione variabile circa da 100 a 110 o più amminoacidi che è tipicamente responsabile del riconoscimento dell'antigene. La porzione carbossi-terminale di ciascuna catena definisce tipicamente una regione costante che può essere responsabile della funzione effettrice. Le catene leggere umane sono tipicamente classificate in catene leggere kappa e lambda. Le catene pesanti sono tipicamente classificate in mu, delta, gamma, alfa o epsilon e definiscono l'isotipo dell'anticorpo come IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, rispettivamente. IgG possiede numerose sottoclassi, ivi incluse, ma non in via limitativa, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM possiede sottoclassi, ivi incluse, ma non in via limitativa, IgM1 e IgM2. IgA è similmente suddiviso in sottoclassi ivi incluse, ma non in via limitativa, IgA1 e IgA2. All'interno delle catene pesante e leggera di lunghezza completa, tipicamente, le regioni variabili e costanti sono unite da una regione "J" di circa 12 o più amminoacidi, laddove la catena pesante include anche una regione "D" di circa 10 o più amminoacidi. Si veda, ad esempio, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Le regioni variabili di ciascun paio di catena leggera/pesante formano tipicamente il sito legante l'antigene.

Le regioni variabili esibiscono tipicamente la stessa struttura generale di regioni framework (FR) relativamente conservate, unite da tre regioni ipervariabili, anche chiamate regioni determinanti complementarietà o CDR. Le CDR delle due catene di ciascun paio sono tipicamente allineate dalle regioni framework che possono rendere possibile il legame a un epitopo specifico. Da N-terminale a C-terminale, le regioni variabili di entrambe le catene leggera e pesante comprendono tipicamente i domini FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. L'assegnazione di amminoacidi a ciascun dominio è tipicamente secondo le definizioni di Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 e 1991)), o Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature*, 342:878-883 (1989).

In talune forme di realizzazione, una catena pesante anticorpale si lega a un antigene in assenza di una catena leggera anticorpale. In talune forme di realizzazione, una catena leggera anticorpale si lega a un antigene in assenza di una catena pesante anticorpale. In talune forme di realizzazione, una regione anticorpale di legame si lega a un antigene in assenza di una catena leggera anticorpale. In talune forme di realizzazione, una regione anticorpale di legame si lega a un antigene in assenza di una catena pesante anticorpale. In

talune forme di realizzazione, una regione variabile individuale si lega specificatamente a un antigene in assenza di altre regioni variabili.

In talune forme di realizzazione, la delineazione definitiva di una CDR e l'identificazione di residui comprendenti il sito di legame di un anticorpo sono condotte, risolvendo la struttura dell'anticorpo e/o risolvendo la struttura del complesso anticorpo-ligando. In talune forme di realizzazione ciò può essere condotto con qualsiasi di svariate tecniche note all'esperto del ramo, quali cristallografia a raggi X. In talune forme di realizzazione, vari metodi di analisi possono essere impiegati per identificare o approssimare le regioni CDR. Esempi di tali metodi includono, ma non in via limitativa, la definizione di Kabat, la definizione di Chothia, la definizione AbM e la definizione di contatto.

La definizione di Kabat è uno standard per la numerazione dei residui in un anticorpo ed è tipicamente utilizzata per identificare le regioni CDR. Si veda, ad esempio, Johnson & Wu, *Nucleic Acids Res.*, 28: 214-8 (2000). La definizione di Chothia è simile alla definizione di Kabat, ma la definizione di Chothia tiene conto di posizioni di talune regioni strutturali ad ansa. Si vedano, ad esempio, Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901-17 (1986); Chothia et al., *Nature*, 342: 877-83 (1989). La definizione di AbM utilizza una suite integrata di programmi informatici, prodotti da Oxford Molecular Group, che modellano la struttura anticorpale. Si vedano, Martin et al., *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 86:9268-9272 (1989); "AbM™, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies," Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd. La definizione di AbM modella la struttura terziaria di un anticorpo da una sequenza primaria, utilizzando una combinazione di database di conoscenza e metodi *ab initio*, quali quelli descritti da Samudrala et al., "Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach," in *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3:194-198 (1999). La definizione di contatto si basa su un'analisi delle strutture cristalline complesse, disponibili. Si veda, ad esempio, MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 5:732-45 (1996).

Per convenzione, alle regioni CDR della catena pesante ci si riferisce tipicamente come aH1, H2 e H3 ed esse sono numerate in sequenza nella direzione dall'estremità ammino-terminale all'estremità carbossi-terminale. Alle regioni CDR nella catena leggera ci si riferisce tipicamente come a L1, L2 e L3 ed esse sono numerate in sequenza nella direzione dall'estremità ammino-terminale all'estremità carbossi-terminale.

Il termine "catena leggera" include una catena leggera di lunghezza intera e suoi frammenti, aventi una sequenza di regione variabile sufficiente a conferire specificità di legame. Una catena leggera di lunghezza intera include un dominio di regione variabile, V_L e un dominio

di regione costante, C_L . Il dominio di regione variabile della catena leggera è in corrispondenza dell'estremità ammino-terminale del polipeptide. Catene leggere includono catene kappa e catene lambda.

Il termine "catena pesante" include una catena pesante di lunghezza intera e suoi frammenti, aventi una sequenza di regione variabile sufficiente a conferire specificità di legame. Una catena pesante di lunghezza intera include un dominio di regione variabile, V_H e tre domini di regione costante, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . Il dominio V_H è in corrispondenza dell'estremità ammino-terminale del polipeptide e i domini C_H sono in corrispondenza dell'estremità carbossi-terminale, laddove C_{H3} è il più vicino all'estremità carbossi-terminale del polipeptide. Le catene pesanti possono essere di qualsiasi isotipo, ivi inclusi IgG (ivi inclusi i sottotipi IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (ivi inclusi i sottotipi IgA1 e IgA2), IgM e IgE.

Un anticorpo bispecifico o trifunzionale è tipicamente un anticorpo ibrido artificiale avente due differenti paia di catene pesante/leggera e due differenti siti di legame. Anticorpi bispecifici possono essere prodotti tramite svariati metodi ivi inclusi, ma non in via limitativa, fusione di ibridomi o collegamento di frammenti Fab'. Si vedano, ad esempio, Songsivilai et al., Clin. Exp. Immunol., 79: 315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-1553 (1992).

Alcune specie di mammifero producono anche anticorpi aventi soltanto una singola catena pesante.

Ciascuna singola catena immunoglobulinica è tipicamente composta da numerosi "domini immunoglobulinici", ciascuno consistente di grossolanamente da 90 a 110 amminoacidi e avente un modello di ripiegamento caratteristico. Questi domini sono le unità di base da cui sono composti i polipeptidi anticorpali. Nell'uomo, gli isotipi IgA e IgD contengono quattro catene pesanti e quattro catene leggere; gli isotipi IgG e IgE contengono due catene pesanti e due catene leggere; e l'isotipo IgM contiene cinque catene pesanti e cinque catene leggere. La regione C di catena pesante comprende tipicamente uno o più domini che possono essere responsabili della funzione effettrice. Il numero di domini di regione costante di catena pesante dipenderà dall'isotipo. Le catene pesanti di IgG, ad esempio, contengono tre domini di regione C, noti come C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . Gli anticorpi che sono forniti possono avere qualsiasi di questi isotipi e sottotipi. In talune forme di realizzazione della presente invenzione, un anticorpo anti-PCSK9 è del sottotipo IgG2 o IgG4.

Il termine "regione variabile" o "dominio variabile" si riferisce a una porzione delle catene pesanti e/o leggere di un anticorpo, tipicamente includenti approssimativamente da 120 a 130 amminoacidi ammino-terminali nella catena pesante e circa da 100 a 110 amminoacidi

ammino-terminali nella catena leggera. In talune forme di realizzazione, le regioni variabili di differenti anticorpi differiscono estesamente nella sequenza amminoacidica anche fra anticorpi della stessa specie. La regione variabile di un anticorpo determina tipicamente la specificità di un particolare anticorpo per il suo target.

Il termine "proteina legante l'antigene neutralizzante" o "anticorpo neutralizzante" si riferisce a una proteina legante l'antigene o un anticorpo, rispettivamente, che si lega a un ligando e previene o riduce l'effetto biologico di quel ligando. Questo può essere fatto, ad esempio, bloccando direttamente un sito di legame sul ligando o legandolo al ligando e alterando la capacità del ligando di legarsi attraverso mezzi indiretti (quali alterazioni strutturali o energetiche nel ligando). In alcune forme di realizzazione, il termine può anche indicare una proteina legante l'antigene che impedisce che la proteina alla quale si lega esplichi una funzione biologica. Nel valutare il legame e/o la specificità di una proteina legante l'antigene, ad esempio un anticorpo o suo frammento immunologicamente funzionale, un anticorpo o frammento può sostanzialmente inibire il legame di un ligando al suo partner di legame, quando un eccesso di anticorpo riduce la quantità di partner di legame legato al ligando almeno circa di 1-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, 97-98%, 98-99% o più (così come misurato in un saggio di legame competitivo *in vitro*). In alcune forme di realizzazione, nel caso di proteine leganti l'antigene contro PCSK9, tale molecola neutralizzante può diminuire la capacità di PCSK9 di legarsi al LDLR. In alcune forme di realizzazione, la capacità neutralizzante è caratterizzata e/o descritta tramite un saggio di competizione. In alcune forme di realizzazione, la capacità neutralizzante è descritta in termini di valore IC_{50} o EC_{50} . In alcune forme di realizzazione, le ABP 27B2, 13H1, 13B5 e 3C4 sono ABP non neutralizzanti, 3B6, 9C9 e 31A4 sono neutralizzanti deboli e le rimanenti ABP in Tabella 2 sono neutralizzanti forti. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi o le proteine leganti l'antigene neutralizzano, legandosi a PCSK9 e impedendo che PCSK9 si leghi al LDLR (o riducendo la capacità di PCSK9 di legarsi al LDLR). In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi o le ABP neutralizzano, legandosi a PCSK9, pur consentendo al contempo che PCSK9 si leghi al LDLR, prevenendo o riducendo la degradazione di LDLR mediata da PCSK9. Così, in alcune forme di realizzazione, una ABP o un anticorpo neutralizzante può comunque permettere il legame PCSK9/LDLR, ma impedirà (o ridurrà) la successiva degradazione di LDLR in cui è implicata PCSK9.

Il termine "target" si riferisce a una molecola o una porzione di una molecola in grado di essere legata da una proteina legante l'antigene. In talune forme di realizzazione, un target

può avere uno o più epitopi. In talune forme di realizzazione, un target è un antigene. L'uso di "antigene" nell'espressione "proteina legante l'antigene" denota semplicemente che la sequenza proteica che comprende l'antigene può essere legata da un anticorpo. In questo contesto, ciò non richiede che la proteina sia estranea o che sia in grado di indurre una risposta immunitaria.

Il termine "competere", quando utilizzato nel contesto di proteine leganti l'antigene (ad esempio, proteine leganti l'antigene neutralizzanti o anticorpi neutralizzanti) che competono per lo stesso epitopo significa la competizione fra proteine leganti l'antigene, come determinato mediante un saggio, in cui la proteina legante l'antigene (ad esempio, anticorpo o suo frammento immunologicamente funzionale) che viene esaminata previene o inibisce (ad esempio, riduce) il legame specifico di una proteina legante l'antigene di riferimento (ad esempio, un ligando o un anticorpo di riferimento) a un antigene comune (ad esempio, PCSK9 o suo frammento). Numerosi tipi di saggi di legame competitivo possono essere utilizzati per determinare se una proteina legante l'antigene compete con un'altra, ad esempio: dosaggio radioimmunologico (RIA) diretto o indiretto in fase solida, immunodosaggio enzimatico (EIA) diretto o indiretto in fase solida, saggio di competizione sandwich (si veda, ad esempio, Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); EIA con biotina-avidina diretto in fase solida (si veda, ad esempio, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619) saggio marcato diretto in fase solida, saggio sandwich marcato diretto in fase solida (si veda, ad esempio, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA a marcatura in fase solida, utilizzando marcatore 1-125 (si veda, ad esempio, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); EIA con biotina-avidina diretto in fase solida (si veda, ad esempio, Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552); e RIA marcato diretto (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Tipicamente, un tale saggio implica l'uso di antigene purificato legato a una superficie solida o a cellule che portano l'una o l'altra di queste, una proteina legante l'antigene non marcata in esame e una proteina legante l'antigene marcata di riferimento. L'inibizione competitiva si misura, determinando la quantità di marcatura legata alla superficie solida o alle cellule in presenza della proteina legante l'antigene in esame. Usualmente, la proteina legante l'antigene in esame è presente in eccesso. Proteine leganti l'antigene, identificate mediante saggio di competizione (proteine leganti l'antigene in competizione) includono proteine leganti l'antigene che si legano allo stesso epitopo delle proteine leganti l'antigene di riferimento e proteine leganti l'antigene che si legano a un epitopo adiacente, sufficientemente prossimale all'epitopo legato dalla proteina legante l'antigene di

riferimento affinché si verifichi ingombro sterico. Dettagli aggiuntivi riguardanti i metodi per determinare un legame competitivo sono forniti negli Esempi qui riportati. Usualmente, quando una proteina legante l'antigene in competizione è presente in eccesso, essa inibirà (ad esempio, ridurrà) il legame specifico di una proteina legante l'antigene di riferimento a un antigene comune almeno del 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% o 75% o più. In alcuni casi, il legame è inibito almeno dell'80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97% o 97% o più.

Il termine "antigene" si riferisce a una molecola o a una porzione di molecola in grado di essere legata da un agente di legame selettivo, quale una proteina legante l'antigene (ivi incluso, ad esempio, un anticorpo o un suo frammento immunologico funzionale). In alcune forme di realizzazione, l'antigene è in grado di essere utilizzato in un animale per produrre anticorpi in grado di legarsi a quell'antigene. Un antigene può possedere uno o più epitopi che sono in grado di interagire con differenti proteine leganti l'antigene, ad esempio anticorpi.

Il termine "epitopo" include qualsiasi determinante in grado di essere legato da una proteina legante l'antigene, quale un anticorpo o un recettore delle cellule T. Un epitopo è una regione di un antigene che è legata da una proteina legante l'antigene che mira a quell'antigene target e, quando l'antigene è una proteina, include specifici amminoacidi che contattano direttamente la proteina legante l'antigene. Più spesso, gli epitopi risiedono su proteine, ma in alcuni casi possono risiedere su altri tipi di molecole, quali acidi nucleici. Determinanti epitopici possono includere raggruppamenti di superficie chimicamente attivi di molecole, quali amminoacidi, catene laterali di zuccheri, gruppi fosforilici o solfonilici e possono avere specifiche caratteristiche strutturali tridimensionali e/o specifiche caratteristiche di carica. Generalmente, anticorpi specifici per un particolare antigene target riconosceranno di preferenza un epitopo sull'antigene target in una miscela complessa di proteine e/o macromolecole.

Come qui utilizzato, "sostanzialmente puro" significa che la specie descritta di molecola è la specie predominante presente, vale a dire su base molare essa è più abbondante di qualsiasi altra specie individuale nella stessa miscela. In talune forme di realizzazione, una molecola sostanzialmente pura è una composizione, in cui la specie in oggetto comprende almeno il 50% (su base molare) di tutte le specie macromolecolari presenti. In altre forme di realizzazione, una composizione sostanzialmente pura comprenderà almeno l'80%, 85%, 90%, 95% o 99% di tutte le specie macromolecolari presenti nella composizione. In altre forme di realizzazione, la specie in oggetto è purificata sino a essenziale omogeneità, in cui

specie contaminanti non possono essere rilevate nella composizione tramite metodi di rilevamento convenzionali e, così, la composizione consiste di una singola specie macromolecolare rilevabile.

Il termine "agente" è qui utilizzato per denotare un composto chimico, una miscela di composti chimici, una macromolecola biologica o un estratto costituito da materiali biologici.

Come qui utilizzati, i termini "marcare" o "marcato" si riferiscono all'incorporazione di un marker rilevabile, ad esempio tramite incorporazione di un amminoacido radiomarcato o attacco a un polipeptide di porzioni funzionali di biotina che possono essere rilevate tramite avidina marcata (ad esempio, streptomicina contenente un marker fluorescente o attività enzimatica che può essere rilevata tramite metodi ottici o colorimetrici). In talune forme di realizzazione, il marcatore o marker può anche essere terapeutico. Vari metodi di marcatura di polipeptidi e glicoproteine sono noti nell'arte e possono essere utilizzati. Esempi di marcatori per polipeptidi includono, ma non in via limitativa, i seguenti: radioisotopi o radionuclidi (ad esempio, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcatori fluorescenti (ad esempio, FITC, rodamina, fosfori lantanidi), marcatori enzimatici (ad esempio, perossidasi di rafano, β -galattosidasi, luciferasi, fosfatasi alcalina), chemiluminescente, gruppi biotinile, epitopi polipeptidici prestabiliti, riconosciuti da un reporter secondario (ad esempio, sequenze di paia in cerniere di leucina, siti di legame per anticorpi secondari, domini leganti metalli, tag epitopici). In talune forme di realizzazione, i marcatori sono attaccati tramite bracci spaziatori di varie lunghezze per ridurre un potenziale ingombro sterico.

Il termine "campione biologico", come qui utilizzato, include, ma non in via limitativa, qualsiasi quantità di una sostanza di un essere vivente o essere in precedenza vivente. Tali esseri viventi includono, ma non in via limitativa, l'uomo, topi, scimmie, ratti, conigli e altri animali. Tali sostanze includono, ma non in via limitativa, sangue, siero, urina, cellule, organi, tessuti, osso, midollo osseo, linfonodi e cute.

Il termine "composizione farmaceutica" (o agente o farmaco), come qui utilizzato, si riferisce a un composto chimico, composizione, agente o farmaco in grado di indurre un effetto terapeutico desiderato, quando appropriatamente somministrato a un paziente. Esso non richiede necessariamente più di un tipo di ingrediente.

Il termine "quantità efficace dal punto di vista terapeutico" si riferisce alla quantità di proteina legante l'antigene contro PCSK9, che si è stabilito produca una risposta terapeutica in un mammifero. Tali quantità efficaci dal punto di vista terapeutico sono prontamente

verificate da un esperto del ramo.

Il termine "modulante", come qui utilizzato, è un composto che cambia o altera l'attività o la funzione di una molecola. Ad esempio, un modulante può causare un incremento o un decremento della grandezza di una certa attività o funzione di una molecola a confronto con la grandezza dell'attività o della funzione osservata in assenza del modulante. In talune forme di realizzazione, un modulante è un inibitore che induce un decremento della grandezza di almeno un'attività o funzione di una molecola. Talune attività e funzioni esemplificative di una molecola includono, ma non in via limitativa, affinità di legame, attività enzimatica e trasduzione del segnale. Taluni inibitori esemplificativi includono, ma non in via limitativa, proteine, peptidi, anticorpi, peptibody, carboidrati o piccole molecole organiche. Peptibody sono descritti, ad esempio, nel brevetto U.S. No. 6,660,843 (corrispondente alla domanda PCT No. WO 01/83525).

I termini "paziente" e "soggetto" sono utilizzati in maniera interscambiabile e includono soggetti animali umani e non umani nonché quelli in cui sia stata formalmente posta diagnosi di disturbi, quelli in cui non siano stati formalmente riconosciuti disturbi, quelli riceventi attenzione medica, quelli a rischio di sviluppare i disturbi, ecc.

Il termine "trattare" e "trattamento" includono trattamenti terapeutici, trattamenti profilattici e applicazioni in cui si riduca il rischio che un soggetto sviluppi un disturbo o un altro fattore di rischio. Il trattamento non richiede la cura completa di un disturbo e abbraccia forme di realizzazione in cui si riducano i sintomi o rischi di fattori sottostanti.

Il termine "prevenire" non richiede l'eliminazione del 100% della possibilità di un evento. Invece, esso denota che la probabilità dell'evenienza dell'evento è stata ridotta in presenza del composto o del metodo.

Tecniche standard possono essere utilizzate per DNA ricombinante, sintesi di oligonucleotidi e coltura e trasformazione tissutale (ad esempio, elettroporazione, lipofezione). Reazioni enzimatiche e tecniche di purificazione possono essere effettuate secondo le specificazioni del produttore o come comunemente condotto nell'arte o come qui descritto. Le tecniche e le procedure precedenti possono essere generalmente effettuate secondo metodi convenzionali ben noti nell'arte e come descritto in vari riferimenti generali e più specifici che sono citati e discussi nel dispiegarsi di tutta la presente descrizione. Si veda, ad esempio, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). A meno che non siano fornite definizioni specifiche, le nomenclature utilizzate in connessione con, e le procedure e le tecniche di laboratorio di, chimica analitica, chimica organica di sintesi e chimica medica

e farmaceutica qui descritte sono quelle ben note e comunemente utilizzate nell'arte. Tecniche standard possono essere utilizzate per sintesi chimiche, analisi chimiche, preparazione, formulazione e erogazione farmaceutici e trattamento dei pazienti.

Proteine leganti l'antigene per PCSK9

La proproteina convertasi subtilisina kexina di tipo 9 (PCSK9) è una serina proteasi coinvolta nella regolazione dei livelli della proteina recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDLR) (Horton *et al.*, 2007; Seidah and Prat, 2007). PCSK9 è un proormone-proproteina convertarsi della famiglia delle subtilisine (S8) delle serine proteasi (Seidah *et al.*, 2003). Una sequenza amminoacidica esemplificativa di PCSK9 umana è presentata come SEQ ID NO: 1 e 3 in FIG. 1A (che illustra il "pro" dominio della proteina sottolineato) e FIG. 1B (che illustra la sequenza di segnale in grassetto e il prodominio sottolineato). Una sequenza codificante per PCSK9 umana esemplificativa è presentata come SEQ ID NO: 2 (FIG. 1B). Come qui descritto, le proteine PCSK9 possono anche includere frammenti della proteina PCSK9 di lunghezza intera. La struttura della proteina PCSK9 è stata risolta mediante due gruppi (Cunningham *et al.*, Nature Structural & Molecular Biology, 2007 e Piper *et al.*, Structure, 15:1-8, 2007). PCSK9 include una sequenza di segnale, un prodominio N-terminale, un dominio catalitico subtilisina-simile e un dominio C-terminale.

Sono qui fornite proteine leganti l'antigene (ABP) che si legano a PCSK9, ivi inclusa PCSK9 umana. In alcune forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene fornite sono polipeptidi che comprendono una o più regioni determinanti complementarietà (CDR), come qui descritto. In alcune proteine leganti l'antigene, le CDR sono incluse in una regione "framework", che orienta le CDR in maniera tale che si ottengano le appropriate proprietà leganti l'antigene della/e CDR. In alcune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene qui fornite possono interferire con, bloccare, ridurre o modulare l'interazione fra PCSK9 e LDLR. Tali proteine leganti l'antigene sono denotate come "neutralizzanti." In alcune forme di realizzazione, può comunque attuarsi il legame fra PCSK9 e LDLR, sebbene la proteina legante l'antigene sia neutralizzante e legata a PCSK9. Ad esempio, in alcune forme di realizzazione, la ABP previene o riduce l'influsso avverso di PCSK9 sul LDLR senza bloccare il sito legante LDLR su PCSK9. Così, in alcune forme di realizzazione, la ABP modula o altera la capacità di PCSK9 di portare alla degradazione di LDLR senza dover impedire l'interazione di legame fra PCSK9 e LDLR. Tali ABP possono essere specificamente descritte come ABP "non competitivamente neutralizzanti". In alcune forme di realizzazione, la ABP neutralizzante si lega a PCSK9 in una localizzazione e/o maniera che impedisce a PCSK9 di legarsi al LDLR. Tali ABP possono essere specificamente

descritte come ABP "competitivamente neutralizzanti". Entrambi i neutralizzanti di cui sopra possono risultare in una quantità maggiore di LDLR libero presente in un soggetto, il che risulta in una quantità maggiore di LDLR che si lega alle LDL (riducendo, in tal modo, la quantità di LDL nel soggetto). A sua volta, questo risulta in una riduzione della quantità di colesterolo sierico presente in un soggetto.

In alcune forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene qui fornite sono in grado di inibire l'attività mediata da PCSK9 (ivi incluso il legame). In alcune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene che si legano a questi epitopi inibiscono, fra l'altro, interazioni fra PCSK9 e LDLR e altri effetti fisiologici mediati da PCSK9. In alcune forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene sono umane, quali anticorpi interamente umani contro PCSK9.

In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega al dominio catalitico di PCSK9. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega alla forma matura di PCSK9. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega nel prodominio di PCSK9. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega selettivamente alla forma matura di PCSK9. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega al dominio catalitico in maniera tale che PCSK9 non possa legarsi o non possa legarsi efficacemente a LDLR. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene non si lega all'estremità C-terminale del dominio catalitico. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene non si lega all'estremità N-terminale del dominio catalitico. In alcune forme di realizzazione, la ABP non si lega all'estremità N- o C-terminale della proteina PCSK9. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega a uno qualsiasi degli epitopi legati da gli anticorpi qui descritti. In alcune forme di realizzazione, questo può essere determinato tramite saggi competitivi fra gli anticorpi qui divulgati e altri anticorpi. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega a un epitopo legato da uno degli anticorpi descritti in Tabella 2. In alcune forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene si legano a uno stato conformazionale specifico di PCSK9 così da impedire che PCSK9 interagisca con il LDLR. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega al dominio V di PCSK9. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega al dominio V di PCSK9 e impedisce (o riduce) che PCSK9 si leghi al LDLR. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega al dominio V di PCSK9 e, pur non impedendo (o riducendo) il legame di PCSK9 al LDLR, la ABP previene o riduce le attività avverse mediate da PCSK9 sul LDLR.

Le proteine leganti l'antigene che sono qui divulgate presentano svariate utilità. Alcune delle proteine leganti l'antigene, ad esempio, sono utili in specifici saggi di legame, purificazione per affinità di PCSK9, in particolare PCSK9 umana o suoi ligandi e in saggi di screening per

identificare altri antagonisti dell'attività di PCSK9. Alcune delle proteine leganti l'antigene sono utili per inibire il legame di PCSK9 al LDLR o inibire le attività mediate da PCSK9.

Le proteine leganti l'antigene possono essere utilizzate in svariate applicazioni terapeutiche, come qui spiegato. Ad esempio, in alcune forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene contro PCSK9 sono utili per trattare condizioni associate alla PCSK9, quali disturbi correlati al colesterolo (o "disturbi correlati al colesterolo sierico"), quali ipercolesterolemia, come qui ulteriormente descritto. Altri usi delle proteine leganti l'antigene includono, ad esempio, la diagnosi di malattie o condizioni associate a PCSK9 e saggi di screening per determinare la presenza o assenza di PCSK9. Alcune delle proteine leganti l'antigene qui descritte sono utili nel trattare conseguenze, sintomi e/o la patologia associata ad attività di PCSK9.

In alcune forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene che sono fornite comprendono una o più CDR (ad esempio, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR). In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene comprende (a) una struttura polipeptidica e (b) una o più CDR che sono inserite nella e/o unite alla struttura polipeptidica. La struttura polipeptidica può assumere svariate forme differenti. Ad esempio, essa può essere o comprendere il framework di un anticorpo esistente in natura o un suo frammento o variante o può essere completamente di natura sintetica. Esempi di varie strutture polipeptidiche sono ulteriormente descritti qui più avanti.

In talune forme di realizzazione, la struttura polipeptidica delle proteine leganti l'antigene è un anticorpo o è derivato da un anticorpo ivi inclusi, ma non in via limitativa, anticorpi monoclonali, anticorpi bispecifici, minibody, anticorpi dominio, anticorpi sintetici (a cui talvolta ci si riferisce qui come a "mimetici anticorpali"), anticorpi chimerici, anticorpi umanizzati, fusioni di anticorpi (a cui talvolta ci si riferisce qui come a "coniugati anticorpali") e porzioni o frammenti di ciascuno, rispettivamente. In alcuni casi, la proteina legante l'antigene è un frammento immunologico di un anticorpo (ad esempio, Fab, Fab', F(ab')₂ o scFv). Le varie strutture sono ulteriormente qui descritte e definite.

Talune delle proteine leganti l'antigene come qui fornite si legano specificamente e/o selettivamente a PCSK9 umana. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene si lega specificamente e/o selettivamente alla proteina PCSK9 umana avente i e/o consistente dei residui 153-692 di SEQ ID NO: 3. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega specificamente e/o selettivamente a PCSK9 umana avente i e/o consistente dei residui 31-152 di SEQ ID NO: 3. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega selettivamente a una proteina PCSK9 umana, come illustrato in FIG. 1A (SEQ ID NO: 1). In alcune forme di

realizzazione, la proteina legante l'antigene si lega specificamente ad almeno un frammento della proteina PCSK9 e/o a una proteina PCSK9 di lunghezza intera con o senza una sequenza di segnale.

In forme di realizzazione, dove la proteina legante l'antigene è utilizzata per applicazioni terapeutiche, una proteina legante l'antigene può inibire, interferire con o modulare una o più attività biologiche di PCSK9. In una forma di realizzazione, una proteina legante l'antigene si lega specificamente a PCSK9 umana e/o inibisce sostanzialmente il legame di PCSK9 umana a LDLR almeno circa del 20%-40%, 40-60%, 60-80%, 80-85% o più (ad esempio, misurando il legame in un saggio di legame competitivo *in vitro*). Alcune delle proteine leganti l'antigene che sono qui fornite sono anticorpi. In alcune forme di realizzazione, la ABP possiede una K_d minore (legandosi più strettamente) di 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} M. In alcune forme di realizzazione, la ABP presenta una IC_{50} per bloccare il legame del LDLR a PCSK9 (D374Y, variante ad alta affinità) minore di 1 microM, da 1000 nM a 100 nM, da 100 nM a 10 nM, da 10 nM a 1 nM, da 1000 pM a 500 pM, da 500 pM a 200 pM, minore di 200 pM, da 200 pM a 150 pM, da 200 pM a 100 pM, da 100 pM a 10 pM, da 10 pM a 1 pM.

Un esempio di dominio costante di catena pesante di IgG2 di un anticorpo anti-PCSK9 della presente invenzione presenta la sequenza amminoacidica come mostrata in SEQ ID NO: 154, FIG. 3KK.

Un esempio di dominio costante di catena pesante di IgG4 di un anticorpo anti-PCSK9 della presente invenzione presenta la sequenza amminoacidica come mostrata in SEQ ID NO: 155, FIG. 3KK.

Un esempio di dominio costante di catena leggera kappa di un anticorpo anti-PCSK9 presenta la sequenza amminoacidica come mostrata in SEQ ID NO: 157, FIG. 3KK.

Un esempio di dominio costante di catena leggera lambda di un anticorpo anti-PCSK9 presenta la sequenza amminoacidica come mostrata in SEQ ID NO: 156, FIG. 3KK.

Le regioni variabili di catene immunoglobuliniche presentano generalmente la stessa struttura complessiva, comprendente regioni framework (FR) relativamente conservate unite da tre regioni ipervariabili, più spesso denominate "regioni determinanti complementarietà" o CDR. Le CDR delle due catene di ciascun paio di catena pesante/catena leggera summenzionato sono tipicamente allineate tramite le regioni framework per formare una struttura che si lega specificamente a un epitopo specifico sulla proteina target (ad esempio, PCSK9). Dall'estremità N-terminale all'estremità C-terminale, regioni variabili di catena pesante e leggera esistenti in natura si conformano tipicamente entrambe con il seguente

ordine di questi elementi: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. È stato ideato un sistema di numerazione per assegnare numeri ad amminoacidi che occupano posizioni in ciascuno di questi domini. Questo sistema di numerazione è definito in Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 and 1991, NIH, Bethesda, MD) o Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342:878-883.

Varie regioni variabili di catena pesante e di catena leggera sono qui fornite e sono illustrate nelle FIGG. 2A-3JJ e 3LL-3BBB. In alcune forme di realizzazione, ciascuna di queste regioni variabili può essere attaccata alle regioni costanti di catena pesante e leggera di cui sopra per formare una catena leggera e pesante completa di un anticorpo, rispettivamente. Inoltre, ciascuna delle sequenze di catena pesante e leggera così generate può essere combinata per formare una struttura anticorpale completa.

Esempi specifici di alcune delle regioni variabili delle catene leggera e pesante degli anticorpi che sono forniti e loro sequenze amminoacidiche corrispondenti sono riassunti in TABELLA 2.

TABELLA 2: Regioni variabili di catena pesante e leggera esemplificative

Anticorpo	Leggera/pesante SEQ ID NO
30A4	5/74
3C4	7/85
23B5	9/71
25G4	10/72
31H4	12/67
27B2	13/87
25A7	15/58
27H5	16/52
26H5	17/51
31D1	18/53
20D10	19/48
27E7	20/54
30B9	21/55
19H9	22/56
26E10	23/49
21B12	23/49
17C2	24/57

23G1	26/50
13H1	28/91
9C9	30/64
9H6	31/62
31A4	32/89
1A12	33/65
16F12	35/79
22E2	36/80
27A6	37/76
28B12	38/77
28D6	39/78
31G11	40/83
13B5	42/69
31B12	44/81
3B6	46/60
5H5	421/419
24F7	425/423
22B11	429/427
30F1	433/431
24B9.1	437/435
24B9.2	441/439
20A5.1	445/443
20A5.2	449/447
20E5.1	453/451
20E5.2	457/455
8A3	461/459
11F1	465/463
12H11	469/467
11H4	473/471
11H8	477/475
11G1	481/479
8A1	485/483

Di nuovo, ciascuna delle catene pesanti variabili esemplificative elencate in Tabella 2 può essere combinata con qualsiasi delle catene leggere variabili esemplificative, mostrate in Tabella 2 per formare un anticorpo. Tabella 2 mostra appaiamenti di catene leggere e pesanti esemplificativi che si riscontrano in numerosi degli anticorpi qui divulgati. In alcuni casi, gli anticorpi includono almeno una catena pesante variabile e una catena leggera variabile da quelle elencate in Tabella 2. In altri casi, gli anticorpi contengono due catene leggere identiche e due catene pesanti identiche. Quale esempio, un anticorpo o una proteina legante l'antigene può contenere una catena pesante e una catena leggera, due catene pesanti o due catene leggere. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene comprende (e/o consiste di) 1, 2 e/o 3 CDR pesanti e/o leggere da almeno una delle sequenze elencate in Tabella 2 (le CDR delle sequenze sono evidenziate nelle FIGG. 2A-3D e altre forme di realizzazione nelle FIGG. 3CCC-3JJJ e 15A-15D). In alcune forme di realizzazione, tutte 6 le CDR (CDR 1-3 dalla leggera (CDRL1, CDRL2, CDRL3) e CDR1-3 dalla pesante (CDRH1, CDRH2 e CDRH3)) sono parte della ABP. In alcune forme di realizzazione, 1, 2, 3, 4, 5 o più CDR sono incluse nella ABP. In alcune forme di realizzazione, una CDR pesante e una CDR leggera dalle CDR nelle sequenze riportate in Tabella 2 sono incluse nella ABP (le CDR per le sequenze riportate in Tabella 2 sono evidenziate nelle FIGG. 2A-3D). In alcune forme di realizzazione, anche sezioni aggiuntive (ad esempio, come illustrato in FIG. 2A-2D, 3A-3D e altre forme di realizzazione in 3CCC-3JJJ e 15A-15D) sono incluse nella ABP. Esempi di CDR e FR per le catene pesanti e leggere annotate in Tabella 2 sono evidenziate nelle FIGG. 2A-3D (e altre forme di realizzazione nelle FIGG. 3CCC-3JJJ e 15A-15D). Sequenze variabili di catena leggera facoltative (che includono CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3 e FR4) possono essere selezionate dalle seguenti: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44, 46, 421, 425, 429, 433, 437, 441, 445, 449, 453, 457, 461, 465, 469, 473, 477, 481 e 485. Sequenze variabili di catena pesante facoltative (che includono CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3 e FR4) possono essere selezionate dalle seguenti: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81, 60, 419, 423, 427, 431, 435, 439, 443, 447, 451, 455, 459, 463, 467, 471, 475, 479 e 483. In alcune delle voci di FIG. 2A-3D, sono identificate variazioni delle sequenze o confini alternativi delle CDR e FR. Queste alternative sono definite con "v1" che segue il nome della ABP. Poiché la maggior parte di queste alternative è minore in natura, nella Tabella sono visualizzate soltanto sezioni con differenze. È inteso che la sezione rimanente della catena leggera o pesante è la stessa mostrata per la ABP di base negli altri pannelli. Così, ad

esempio, 19H9v1 in FIG. 2C possiede le stesse FR1, CDR1 e FR2 di 19H9 in FIG. 2A, dal momento che l'unica differenza è annotata in FIG. 2C. Per tre delle sequenze di acido nucleico (26E10, 30B9 e 31B12 di ABP), sequenze di acido nucleico alternative aggiuntive sono fornite nelle Figure. Come apprezzerà un esperto del ramo, non più di una di tali sequenze deve essere necessariamente utilizzata di fatto nella creazione di un anticorpo o ABP. Infatti, in alcune forme di realizzazione, soltanto uno o nessuno degli specifici acidi nucleici di catena pesante o leggera deve essere necessariamente presente.

In alcune forme di realizzazione, ABP è codificata da una sequenza di acido nucleico che può codificare per qualsiasi delle sequenze proteiche in Tabella 2.

In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega selettivamente alla forma di PCSK9 che si lega al LDLR (ad esempio, la forma autocatalizzata della molecola). In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene non si lega all'estremità C-terminale del dominio catalitico (ad esempio a quasi tutti 5. 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40 amminoacidi a livello dell'estremità C-terminale). In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene non si lega all'estremità N-terminale del dominio catalitico (ad esempio a quasi tutti 5. 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40 amminoacidi a livello dell'estremità N-terminale). In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega ad amminoacidi entro gli amminoacidi 1-100 della forma matura di PCSK9. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega ad amminoacidi entro gli (e/o sequenze amminoacidiche consistenti degli) amminoacidi 31-100, 100-200, 31-152, 153-692, 200-300, 300-400, 452-683, 400-500, 500-600, 31-692, 31-449 e/o 600-692. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega al dominio catalitico. In alcune forme di realizzazione, la ABP neutralizzante e/o non neutralizzante si lega al prodominio. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega a entrambi il dominio catalitico e il prodominio. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega al dominio catalitico così da ostruire un'area sul dominio catalitico che interagisce con il prodominio. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega al dominio catalitico a livello di una localizzazione o superficie con cui il prodominio interagisce, come evidenziato in Piper et al. (Structure 15:1-8 (2007)).

In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega al dominio catalitico e limita la mobilità del prodominio. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega al dominio catalitico senza legarsi al prodominio. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega al dominio catalitico senza legarsi al prodominio, impedendo al contempo al prodominio di riorientarsi per consentire alla PCSK9 di legarsi al LDLR. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega nello stesso epitopo di quelli circostanti i residui 149-152 del prodominio in Piper et al. In

alcune forme di realizzazione, le ABP si legano al solco (come evidenziato in Piper et al.) sul dominio V. In alcune forme di realizzazione, le ABP si legano al pezzo ricco di istidina, prossimalmente al solco sul dominio V. In alcune forme di realizzazione, tali anticorpi (che si legano al dominio V) non sono neutralizzanti. In alcune forme di realizzazione, anticorpi che si legano al dominio V sono neutralizzanti. In alcune forme di realizzazione, le ABP neutralizzanti impediscono il legame di PCSK9 al LDLR. In alcune forme di realizzazione, le ABP neutralizzanti, pur prevenendo la degradazione del LDLR indotta da PCSK9, non prevengono il legame di PCSK9 al LDLR (ad esempio, ABP 31A4). In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega alle o blocca almeno una delle istidine illustrate in Figura 4 del documento cartaceo di Piper et al. In alcune forme di realizzazione, la ABP blocca la triade catalitica in PCSK9.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo si lega selettivamente a proteine PCSK9 varianti, ad esempio D374Y rispetto a PCSK9 di tipo selvatico. In alcune forme di realizzazione, questi anticorpi si legano alla variante con una forza almeno doppia di quella con cui si legano al di tipo selvatico e preferibilmente 2-5, 5-10, 10-100, 100-1000, 1000-10000 volte di più o più al mutante rispetto al di tipo selvatico (come misurato tramite K_d). In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo inibisce selettivamente la PCSK9 D374Y variante nell'interazione con LDLR rispetto alla capacità di PCSK9 di tipo selvatico di interagire con LDLR. In alcune forme di realizzazione, questi anticorpi bloccano la capacità di una variante di legarsi a LDLR più fortemente della capacità del di tipo selvatico, con forza almeno doppia rispetto al di tipo selvatico e preferibilmente 2-5, 5-10, 10-100, 100-1000 volte di più o più al mutante rispetto al di tipo selvatico (come misurato tramite IC_{50}). In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo si lega a e neutralizza entrambe PCSK9 di tipo selvatico e forme varianti di PCSK9, quali D374Y, in misura simile. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo si lega a PCSK9 per impedire che varianti di LDLR si leghino a PCSK9. In alcune forme di realizzazione, le varianti di LDLR sono per almeno il 50% identiche al LDLR umano. Si fa notare che varianti di LDLR sono note all'esperto del ramo (ad esempio, Brown MS et al, "Calcium cages, acid baths and recycling receptors" Nature 388: 629-630, 1997). In alcune forme di realizzazione, la ABP può innalzare il livello di LDLR efficace nella ipercolesterolemia familiare in eterozigosi (dove è presente una variante in senso di perdita di funzione del LDLR).

In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega a (ma non blocca) varianti di PCSK9 che presentano una percentuale di identità almeno del 50%, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99 o maggiore rispetto alla forma di PCSK9 illustrata in FIG. 1A e/o FIG. 1B. In alcune

forme di realizzazione, la ABP si lega a (ma non blocca) varianti di PCSK9 che presentano una percentuale di identità almeno del 50%, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99 o maggiore rispetto alla forma matura di PCSK9 illustrata in FIG. 1A e/o FIG. 1B. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega a e impedisce che varianti di PCSK9 che presentano una percentuale di identità almeno del 50%, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99 o maggiore rispetto alla forma di PCSK9 illustrata in FIG. 1A e/o FIG. 1B. interagiscano con LDLR. In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega a e impedisce che varianti di PCSK9 che presentano una percentuale di identità almeno del 50%, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99 o maggiore rispetto alla forma matura di PCSK9 illustrata in FIG. 1B. interagiscano con LDLR. In alcune forme di realizzazione, la variante di PCSK9 è una variante umana, quali varianti in corrispondenza della posizione 474, E620G e/o E670G. In alcune forme di realizzazione, l'amminoacido in posizione 474 è valina (come in altri soggetti umani) o treonina (come nel cinomolgo e nel topo). Alla luce dei dati di reattività crociata qui presentati, si ritiene che i presenti anticorpi si legheranno prontamente alle varianti sopra discusse.

In alcune forme di realizzazione, la ABP si lega a un epitopo legato da uno degli anticorpi descritti in Tabella 2. In alcune forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene si legano a uno stato conformazionale specifico di PCSK9 così da impedire che PCSK9 interagisca con il LDLR.

Proteine leganti l'antigene umanizzate (ad esempio, anticorpi)

Come qui descritto, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 può comprendere un anticorpo umanizzato e/o una sua parte. Un'applicazione pratica importante di una tale strategia è la "umanizzazione" del sistema immunitario umorale del topo.

In talune forme di realizzazione, un anticorpo umanizzato è sostanzialmente non immunogeno nell'uomo. In talune forme di realizzazione, un anticorpo umanizzato possiede sostanzialmente la stessa affinità per un target di un anticorpo di un'altra specie, da cui l'anticorpo umanizzato è derivato. Si vedano, ad esempio, brevetto U.S. 5,530,101, brevetto U.S. 5,693,761; brevetto U.S. 5,693,762; brevetto U.S. 5,585,089.

In talune forme di realizzazione, sono identificati amminoacidi di un dominio variabile anticorpale che possono essere modificati senza diminuire l'affinità nativa del dominio legante l'antigene, riducendone al contempo l'immunogenicità. Si vedano, ad esempio, i brevetti U.S. No. 5,766,886 e 5,869,619.

In talune forme di realizzazione, la modificazione di un anticorpo mediante metodi noti nell'arte è tipicamente progettata per ottenere un'affinità di legame aumentata per un target

e/o per ridurre l'immunogenicità dell'anticorpo nel ricevente. In talune forme di realizzazione, gli anticorpi umanizzati sono modificati per eliminare siti di glicosilazione al fine di aumentare l'affinità dell'anticorpo per il suo antigene affine. Si veda, ad esempio, Co et al., *Mol. Immunol.*, 30:1361-1367 (1993). In talune forme di realizzazione, tecniche quali "risagomatura", "iperchimerizzazione" o "impiallacciatura/rimodellamento" sono utilizzate per produrre anticorpi umanizzati. Si vedano, ad esempio, Vaswami et al., *Annals of Allergy, Asthma, & Immunol.* 81:105 (1998); Roguska et al., *Prot. Engineer.*, 9:895-904 (1996); e il brevetto U.S. No. 6,072,035. In talune di tali forme di realizzazione, tali tecniche tipicamente riducono l'immunogenicità anticorpale, riducendo il numero di residui estranei, ma non prevengono risposte anti-idiotipiche né anti-allotipiche che fanno seguito a una somministrazione ripetuta degli anticorpi. Taluni altri metodi per ridurre l'immunogenicità sono descritti, ad esempio, in Gilliland et al., *J. Immunol.*, 62(6): 3663-71 (1999).

In taluni casi, gli anticorpi umanizzanti risultano in una perdita di capacità legante l'antigene. In talune forme di realizzazione, gli anticorpi umanizzati sono "retro-mutati." In talune di tali forme di realizzazione, l'anticorpo umanizzato è mutato per includere uno o più dei residui amminoacidici riscontrati nell'anticorpo del donatore. Si veda, ad esempio, Saldanha et al., *Mol Immunol* 36:709-19 (1999).

In talune forme di realizzazione, le regioni determinanti complementarietà (CDR) delle regioni variabili di catena leggera e pesante di un anticorpo contro PCSK9 possono essere innestate su regioni framework (FR) dalla medesima, o da un'altra, specie. In talune forme di realizzazione, le CDR delle regioni variabili di catena leggera e pesante di un anticorpo contro PCSK9 possono essere innestate su FR umane consenso. Per creare FR umane consenso, in talune forme di realizzazione FR da numerose sequenze amminoacidiche di catena pesante o di catena leggera umane sono allineate per identificare una sequenza amminoacidica consenso. In talune forme di realizzazione, le FR di un anticorpo contro PCSK9 di catena pesante o catena leggera sono sostituite da FR da una differente catena pesante o catena leggera. In talune forme di realizzazione, amminoacidi rari nelle FR delle catene pesanti e leggeri di un anticorpo contro PCSK9 non sono sostituiti, mentre il resto degli amminoacidi delle FR è sostituito. Amminoacidi rari sono specifici amminoacidi che si trovano in posizioni, in corrispondenza delle quali essi non si ritrovano usualmente nelle FR. In talune forme di realizzazione, le regioni variabili innestate, da un anticorpo contro PCSK9, possono essere utilizzate con una regione costante che è differente dalla regione costante di un anticorpo contro PCSK9. In talune forme di realizzazione, le regioni variabili innestate costituiscono parte di un anticorpo Fv a singola catena. L'innesto di CDR è

descritto, ad esempio, nei brevetti U.S. No. 6,180,370, 6,054,297, 5,693,762, 5,859,205, 5,693,761, 5,565,332, 5,585,089 e 5,530,101 e in Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988), Winter, FEBS Letts., 430:92-94 (1998).

Proteine leganti l'antigene umane (ad esempio, anticorpi)

Come qui descritto, una proteina legante l'antigene che si lega a PCSK9 può comprendere un anticorpo umano (ossia, completamente umano) e/o una sua parte. In talune forme di realizzazione, sono fornite sequenze nucleotidiche codificanti per, e sequenze amminoacidiche comprendenti, molecole immunoglobuliniche di catena pesante e leggera, in particolar modo sequenze corrispondenti alle regioni variabili. In talune forme di realizzazione, sono fornite sequenze corrispondenti a regioni determinanti la complementarietà (CDR), specificamente da CDR1 a CDR3. Secondo talune forme di realizzazione, è fornita una linea cellulare di ibridoma esprimente una tale molecola immunoglobulinica. Secondo talune forme di realizzazione, è fornita una linea cellulare di ibridoma esprimente un tale anticorpo monoclonale. In talune forme di realizzazione, una linea cellulare di ibridoma è selezionata da almeno una delle linee cellulari descritte in Tabella 2, ad esempio 21B12, 16F12 e 31H4. In talune forme di realizzazione, è fornito un anticorpo monoclonale umano purificato contro PCSK9 umana.

È possibile ingegnerizzare ceppi di topo deficitari di produzione anticorpale nel topo con grandi frammenti dei loci umani per le Ig tempestivamente in maniera tale che i topi producano anticorpi umani in assenza di anticorpi di topo. Grandi frammenti di Ig umane possono mantenere la grande diversità genica variabile nonché l'appropriata regolazione della produzione e dell'espressione anticorpale. Sfruttando il macchinario del topo per la diversificazione e selezione degli anticorpi e la mancanza di tolleranza immunologica per le proteine umane, il repertorio anticorpale umano riprodotto in questi ceppi di topo può portare all'ottenimento di anticorpi completamente umani ad alta affinità contro qualsiasi antigene di interesse, ivi inclusi antigeni umani. Utilizzando la tecnologia dell'ibridoma, possono essere prodotti e selezionati MAb umani antigene-specifici con la specificità desiderata. Taluni metodi esemplificativi sono descritti in WO 98/24893, brevetto U.S. No. 5,545,807, EP 546073 e EP 546073.

In talune forme di realizzazione, è possibile utilizzare regioni costanti da specie differenti dalla specie umana insieme a regione(i) variabile(i) umana(e).

La capacità di clonare e ricostruire loci umani con le dimensioni di megabasi in cromosomi artificiali di lievito (YAC) e introdurli nella linea germinale di topo fornisce un approccio

per fare chiarezza sulle componenti funzionali di loci molto grandi o mappati imprecisamente nonché per generare modelli utili di malattia umana. Inoltre, l'utilizzo di una tale tecnologia per la sostituzione di loci di topo con loro equivalenti umani potrebbe fornire approfondimenti circa l'espressione e la regolazione di prodotti genici umani durante lo sviluppo, la loro comunicazione con altri sistemi e il loro coinvolgimento nell'induzione e nella progressione delle malattie.

Gli anticorpi umani evitano alcuni dei problemi associati ad anticorpi che posseggono regioni variabili e/o costanti murine o di ratto. La presenza di tali proteine di derivazione murina o di ratto può portare alla rapida clearance degli anticorpi o può portare alla generazione di una risposta immunitaria contro l'anticorpo da parte di un paziente. Al fine di evitare l'uso di anticorpi di derivazione murina o di ratto, anticorpi completamente umani possono essere generati attraverso l'introduzione di loci umani funzionali per gli anticorpi in un roditore, altro mammifero o animale in maniera tale che il roditore, altro mammifero o animale produca anticorpi completamente umani.

Anticorpi umanizzati sono quegli anticorpi che, pur inizialmente contenendo sequenze amminoacidiche per gli anticorpi che sono non umane, hanno poi visto alcune di queste sequenze amminoacidiche non umane per gli anticorpi sostituite con sequenze per anticorpi umane. Questo è in contrasto con anticorpi umani, in cui l'anticorpo è codificato (o in grado di essere codificato) da geni posseduti da un essere umano.

Varianti di proteine leganti l'antigene

Altri anticorpi che sono forniti sono varianti delle ABP elencate sopra, formate dalla combinazione o da sottoparti delle catene pesante variabile e leggera variabile mostrate in Tabella 2 e comprendono catene leggere variabili e/o pesanti variabili ciascuna avente un'identità di almeno il 50%, 50-60, 60-70, 70-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, 97-99% o più del 99% con le sequenze amminoacidiche delle sequenze in Tabella 2 (sequenza intera o una sottoparte della sequenza, ad esempio una o più CDR). In alcuni casi, tali anticorpi includono almeno una catena pesante e una catena leggera, mentre, in altri casi, le forme varianti contengono due catene leggere identiche e due catene pesanti identiche (o loro sottoparti). In alcune forme di realizzazione, il confronto delle sequenze in FIG. 2A-3D (e 13A-13J, in altre forme di realizzazione in 15A-15D e FIG. 48A e 48B) possono essere utilizzate al fine di identificare le sezioni degli anticorpi che possono essere modificate osservando quelle variazioni che interessano il legame e quelle variazioni che non sembra interessino il legame. Ad esempio, confrontando sequenze simili, è possibile identificare quelle sezioni (ad esempio, particolari amminoacidi) che possono essere modificate o come

esse possono essere modificate, mantenendo pur sempre (o migliorando) la funzionalità della ABP. In alcune forme di realizzazione, varianti di ABP includono quei gruppi e sequenze consenso illustrati nelle FIGG. 13A, 13C, 13F, 13G, 13H, 13I, 13J, e/o 48A e 48B e le variazioni sono lasciate nelle posizioni identificate come variabili nelle figure. Le CDR mostrate nelle FIGG. 13A, 13C, 13F, 13G, 48A e 48B sono state definite sulla base di una combinazione ibrida del metodo Chothia (basato sulla localizzazione delle regioni ad ansa strutturali, si veda, ad esempio, "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins," Bissan Al-Lazikani, Arthur M. Lesk and Cyrus Chothia, *Journal of Molecular Biology*, 273(4): 927-948, 7 November (1997)) e il metodo di Kabat, basato su variabilità di sequenza, si veda, ad esempio, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition. Pubblicazione NIH N. 91-3242, Kabat et al., (1991)). Ciascun residuo determinato da uno o l'altro metodo è stato incluso nell'elenco finale di residui delle CDR (ed è presentato nelle FIGG. 13A, 13C, 13F, 13G e 48A e 48B). Le CDR in FIGG. 13H, 13I e 13J sono state ottenute con il solo metodo di Kabat. A meno che non sia altrimenti specificato, le sequenze consenso definite, CDR e FR in FIGG. 13H-13J definiranno e controlleranno le CDR e FR annotate per le ABP riferite in FIG. 13.

In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene comprende una catena pesante comprendente una regione variabile comprendente una sequenza amminoacidica per almeno il 90% identica a una sequenza amminoacidica selezionata da almeno una delle sequenze di SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 e 60. In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene comprende una catena pesante comprendente una regione variabile comprendente una sequenza amminoacidica per almeno il 95% identica a una sequenza amminoacidica selezionata da almeno una delle sequenze di SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 e 60. In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene comprende una catena pesante comprendente una regione variabile comprendente una sequenza amminoacidica per almeno il 99% identica a una sequenza amminoacidica selezionata da almeno una delle sequenze di SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 e 60.

In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene comprende una sequenza che è per almeno il 90%, 90-95% e/o 95-99% identica a una o più CDR dalle CDR in almeno una delle sequenze di SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 e 60. In alcune forme di realizzazione,

sono presenti 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR (ciascuna identica per almeno il 90%, 90-95%, e/o 95-99% alle sequenze sopra riportate).

In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene comprende una sequenza che è per almeno il 90%, 90-95% e/o 95-99% identica a una o più FR dalle FR in almeno una delle sequenze di SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 e 60. In alcune forme di realizzazione, sono presenti 1, 2, 3 o 4 FR (ciascuna identica per almeno il 90%, 90-95%, e/o 95-99% alle sequenze sopra riportate).

In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene comprende una catena leggera comprendente una regione variabile comprendente una sequenza amminoacidica per almeno il 90% identica a una sequenza amminoacidica selezionata da almeno una delle sequenze di SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 e 46. In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene comprende una catena leggera comprendente una regione variabile comprendente una sequenza amminoacidica per almeno il 90% identica a una sequenza amminoacidica selezionata da almeno una delle sequenze di SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 e 46. In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene comprende una catena leggera comprendente una regione variabile comprendente una sequenza amminoacidica per almeno il 90% identica a una sequenza amminoacidica selezionata da almeno una delle sequenze di SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 e 46.

In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene comprende una sequenza che è per almeno il 90%, 90-95% e/o 95-99% identica a una o più CDR dalle CDR in almeno una delle sequenze di SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 e 46. In alcune forme di realizzazione, sono presenti 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR (ciascuna identica per almeno il 90%, 90-95%, e/o 95-99% alle sequenze sopra riportate).

In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene comprende una sequenza che è per almeno il 90%, 90-95% e/o 95-99% identica a una o più FR dalle FR in almeno una delle sequenze di SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 e 46. In alcune forme di realizzazione, sono presenti 1, 2, 3 o 4 FR (ciascuna identica per almeno il 90%, 90-95%, e/o 95-99% alle sequenze sopra riportate).

Alla luce della presente divulgazione, un esperto del ramo sarà in grado di determinare varianti adatte delle ABP come qui esposto, utilizzando tecnologie ben note. In talune forme di realizzazione, un esperto del ramo può identificare aree adatte della molecola che possono essere cambiate senza distruggere l'attività, mirando a regioni target non ritenute importanti per l'attività. In talune forme di realizzazione, è possibile identificare residui e porzioni delle molecole che sono conservati tra polipeptidi simili. In talune forme di realizzazione, persino aree che possono essere importanti per l'attività biologica o per la struttura possono essere oggetto di sostituzioni amminoacidiche conservative senza distruggere l'attività biologica o senza interessare in modo avverso la struttura polipeptidica.

Inoltre, un tecnico del ramo può rivedere gli studi di struttura-funzione identificando residui in polipeptidi simili che sono importanti per l'attività o la struttura. Alla luce di un tale confronto è possibile predire l'importanza di residui amminoacidici in una proteina che corrispondono a residui amminoacidici importanti per l'attività o struttura in proteine simili. Un tecnico del ramo può optare per sostituzioni amminoacidiche chimicamente analoghe per tali residui amminoacidici importanti predetti.

Un esperto del ramo può altresì analizzare la struttura tridimensionale e la sequenza amminoacidica in relazione a quella struttura in ABP simili. Alla luce di tali informazioni, un esperto del ramo può predire l'allineamento di residui amminoacidici di un anticorpo rispetto alla sua struttura tridimensionale. In talune forme di realizzazione, un esperto del ramo può scegliere di non apportare radicali cambiamenti a residui amminoacidici che si prevede siano sulla superficie della proteina, poiché tali residui potrebbero essere coinvolti in importanti interazioni con altre molecole. Inoltre, un esperto del ramo può generare varianti in esame contenenti una singola sostituzione amminoacidica per ciascun residuo amminoacidico desiderato. Le varianti possono poi essere sottoposte a screening, utilizzando saggi di attività noti all'esperto del ramo. Tali varianti possono essere utilizzate per raccogliere informazioni circa varianti adatte. Ad esempio, se si scoprisse che un cambiamento apportato a un particolare residuo amminoacidico risulta in un'attività distrutta, ridotta contro desiderio o inadatta, le varianti con un tale cambiamento potranno essere evitate. In altri termini, sulla base delle informazioni raccolte da tali esperimenti di routine, un tecnico del ramo può prontamente determinare gli amminoacidi a livello dei quali ulteriori sostituzioni devono essere evitate da sole o in combinazione con altre mutazioni.

Un certo numero di pubblicazioni scientifiche è stato dedicato alla previsione della struttura secondaria. Si vedano Moulton J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4):422-427 (1996), Chou et al., *Biochemistry*, 13(2):222-245 (1974); Chou et al., *Biochemistry*, 113(2):211-222 (1974);

Chou et al., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148 (1978); Chou et al., Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 e Chou et al., Biophys. J., 26:367-384 (1979). Inoltre, programmi informatici sono attualmente disponibili per assistere la previsione della struttura secondaria. Un metodo per predire la struttura secondaria si basa sul modellamento per omologia. Ad esempio, due polipeptidi o proteine che hanno un'identità di sequenza maggiore del 30%, o similarità maggiore del 40% potranno avere topologie strutturali analoghe. La crescita recente della banca dati strutturale delle proteine (PDB) ha fornito una prevedibilità potenziata della struttura secondaria, incluso il numero potenziale di ripiegamenti all'interno della struttura di un polipeptide o di una proteina. Si veda Holm et al., Nucl. Acid. Res. È stato suggerito (Brenner et al., Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376 (1997)) che vi è un numero limitato di ripiegamenti in un dato polipeptide o proteina e che, una volta risolto un numero critico di strutture, la previsione strutturale diverrà drasticamente più accurata.

Metodi aggiuntivi di previsione di strutture secondarie includono "threading" (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87 (1997); Sippl et al., Structure, 4(1):15-19 (1996)), "analisi di profili" (Bowie et al., Science, 253:164-170 (1991); Gribskov et al., Meth. Enzym., 183:146-159 (1990); Gribskov et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84(13):4355-4358 (1987)), e "collegamento evolutivo (si vedano Holm, *supra* (1999) e Brenner, *supra* (1997)). in talune forme di realizzazione, varianti di proteine leganti l'antigene includono varianti di glicosilazione, in cui il numero e/o il tipo di siti di glicosilazione è stato alterato a confronto con le sequenze amminoacidiche di un polipeptide parentale. In determinate forme di realizzazione, le varianti di proteina comprendono un numero maggiore o minore di siti di glicosilazione collegati a N rispetto alla proteina nativa. Un sito di glicosilazione collegato a N è caratterizzato dalla sequenza: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, in cui il residuo amminoacidico designato con X può essere qualsiasi residuo amminoacidico, ad eccezione di prolina. La sostituzione di residui amminoacidici per creare questa sequenza fornisce un nuovo sito potenziale per l'aggiunta di una catena di carboidrati collegata a N. In alternativa, sostituzioni che eliminano questa sequenza rimuoveranno una catena carboidratica preesistente collegata a N. È altresì qui fornita una trasposizione delle catene carboidratiche collegate a N, in cui uno o più siti di glicosilazione (tipicamente quelli che sono esistenti in natura) sono eliminati e uno o più nuovi siti collegati a N sono creati. Varianti anticorpali preferite aggiuntive includono varianti di cisteina in cui uno o più residui di cisteina sono deleti da o sostituiti con un altro amminoacido (ad esempio, serina) a confronto con la sequenza amminoacidica parentale. Le varianti di cisteina possono essere utili quando gli

anticorpi devono essere ripiegati in una conformazione biologicamente attiva tale da alterare l'isolamento di corpi di inclusione insolubili. Le varianti di cisteina hanno generalmente meno residui di cisteina della proteina nativa e hanno tipicamente un numero pari per rendere minime le interazioni risultanti da cisteine non appaiate.

Secondo talune forme di realizzazione, sostituzioni amminoacidiche sono quelle che: (1) riducono la suscettibilità alla proteolisi, (2) riducono la suscettibilità all'ossidazione, (3) alterano l'affinità di legame per formare complessi proteici, (4) alterano le affinità di legame e/o (4) conferiscono o modificano altre proprietà fisico-chimiche o funzionali su tali polipeptidi. Secondo talune forme di realizzazione, sostituzioni amminoacidiche singole o multiple (in talune forme di realizzazione, sostituzioni amminoacidiche conservative) possono essere apportate alla sequenza esistente in natura (in talune forme di realizzazione nella porzione del polipeptide all'esterno del dominio formante contatti intermolecolari). In talune forme di realizzazione, una sostituzione amminoacidica conservativa tipicamente può non cambiare sostanzialmente le caratteristiche strutturali della sequenza parentale (ad esempio, un amminoacido di rimpiazzo non deve tendere a rompere un'elica che è presente nella sequenza parentale né distruggere altri tipi di struttura secondaria che caratterizzano la sequenza parentale). Esempi di strutture secondarie e terziarie polipeptidiche riconosciute nell'arte sono descritti in *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden & J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); e Thornton et al., *Nature*, 354:105 (1991).

In alcune forme di realizzazione, le varianti sono varianti delle sequenze di acido nucleico delle ABP qui divulgate. Un esperto del ramo apprezzerà che la discussione sopra trattata può essere utilizzata per identificare, valutare e/o creare varianti di proteine ABP, sequenze di acido nucleico che possono codificare per quelle varianti di proteina. Così, sono contemplate sequenze di acido nucleico codificanti per quelle varianti di proteina (nonché sequenze di acido nucleico che codificano per le ABP in Tabella 2, ma sono differenti da quelle esplicitamente qui divulgate). Ad esempio, una variante di ABP può avere un'identità di almeno 80, 80-85, 85-90, 90-95, 95-97, 97-99 o più con almeno una sequenza di acido nucleico descritta in SEQ ID NO: 152, 153, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151 o almeno da una a sei (e varie loro combinazioni) delle CDR codificate dalle sequenze di acido nucleico in SEQ ID

NO: 152, 153, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 e 151.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo (o sequenza di acido nucleico che codifica per esso) è una variante, se la sequenza di acido nucleico che codifica per la particolare ABP (o la sequenza di acido nucleico stessa) può selettivamente ibridare con qualsiasi delle sequenze di acido nucleico che codificano per le proteine in Tabella 2 (quali, ma non in via limitativa, SEQ ID NO: 152, 153, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 e 151) in condizioni stringenti. In una forma di realizzazione, adatte condizioni moderatamente stringenti includono il prelavaggio in una soluzione di 5X SSC; SDS 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); ibridazione a 50°C, -65°C, 5x SSC, per l'intera notte o, nel caso di omologia crociata fra le specie, a 45°C con 0,5x SSC; seguito da lavaggio due volte a 65°C per 20 minuti con ciascuno di 2x, 0,5x e 0,2x SSC contenente SDS 0,1%. Tali sequenze di DNA di ibridazione rientrano anch'esse nell'ambito di questa divulgazione, poiché sono sequenze nucleotidiche che, per via della degenerazione del codice, codificano per un polipeptide anticorpale che è codificato da una sequenza di DNA di ibridazione e dalle sequenze amminoacidiche che sono codificate da queste sequenze di acido nucleico. In alcune forme di realizzazione, varianti di CDR includono sequenze di acido nucleico e le sequenze amminoacidiche codificate da quelle sequenze, che ibridano con una o più delle CDR entro le sequenze sopra annotate (le CDR singole possono prontamente essere determinate alla luce delle FIGG. 2A-3D e altre forme di realizzazione nelle FIGG. 3CCC-3JJJ e 15A-15D). La frase "ibrida selettivamente" a cui si fa riferimento in questo contesto significa legarsi in maniera rilevabile in maniera selettiva. Polinucleotidi, oligonucleotidi e loro frammenti secondo la divulgazione ibridano selettivamente filamenti di acido nucleico sotto ibridazione e condizioni di lavaggio che rendono minime quantità apprezzabili di legame rilevabile con acidi nucleici aspecifici. Condizioni di alta stringenza possono essere utilizzate per ottenere condizioni di ibridazione selettive, come noto nell'arte e qui discusso. Generalmente, l'omologia di sequenza di acido nucleico fra polinucleotidi, oligonucleotidi e frammenti della divulgazione e una sequenza di acido nucleico di interesse sarà di almeno l'80% e più tipicamente con omologie preferibilmente crescenti di almeno 85%, 90%, 95%, 99% e 100%. Due sequenze amminoacidiche sono omologhe, se vi è una

identità parziale o completa fra le loro sequenze. Ad esempio, 85% di omologia significa che l'85% degli amminoacidi è identico, quando le due sequenze sono allineate per il massimo appaiamento: Gap (in una o nell'altra delle due sequenze che vengono appaiate) sono consentiti nel rendere massimo l'appaiamento; lunghezze di gap di 5 o meno sono preferite laddove 2 o meno sono più preferite. In alternativa e preferibilmente, due sequenze di proteine (o sequenze polipeptidiche derivate da loro di almeno 30 amminoacidi di lunghezza) sono omologhe, così come questo termine è qui utilizzato, se hanno un punteggio di allineamento al più di 5 (in unità di deviazione standard) utilizzando il programma ALIGN con la matrice dei dati di mutazione e la penalità di gap di 6 o più. Si vedano Dayhoff, M. O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, pagg. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) e il Supplemento 2 a questo volume, pagg. 1-10. Le due sequenze o loro parti sono più preferibilmente omologhe, se i loro amminoacidi sono più grandi di o uguali al 50% identici quando ottimamente allineate, utilizzando il programma ALIGN. il termine "corrisponde a" è qui utilizzato per significare che una sequenza polinucleotidica è omologa (ossia è identica, non strettamente correlata dal punto di vista dell'evoluzione) a tutta o una porzione di una sequenza polinucleotidica di riferimento o che una sequenza polipeptidica è identica a una sequenza polipeptidica di riferimento. Per contraddistinguere, il termine "complementare a" è qui utilizzato per significare che la sequenza complementare è omologa a tutta o una porzione di una sequenza polinucleotidica di riferimento. A titolo illustrativo, la sequenza nucleotidica "TATAC" corrisponde a una sequenza di riferimento "TATAC" ed è complementare a una sequenza di riferimento "GTATA".

Preparazione di proteine leganti l'antigene (ad esempio, anticorpi)

In talune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene (quali anticorpi) sono prodotte mediante immunizzazione con un antigene (ad esempio PCSK9). In talune forme di realizzazione, gli anticorpi possono essere prodotti mediante immunizzazione con PCSK9 di lunghezza intera, una forma solubile di PCSK9, il dominio catalitico da solo, la forma umana di PCSK9 mostrata in FIG. 1A, una forma variante di splicing di PCSK9 o un suo frammento. In talune forme di realizzazione, gli anticorpi qui descritti possono essere policlonali o monoclonali e/o possono essere anticorpi ricombinanti. In talune forme di realizzazione, gli anticorpi dell'invenzione sono anticorpi umani preparati, ad esempio, mediante immunizzazione di animali transgenici in grado di produrre anticorpi umani (si veda, ad esempio, domanda pubblicata PCT No. WO 93/12227).

In talune forme di realizzazione, certe strategie possono essere impiegate per manipolare

proprietà pertinenti di un anticorpo, quale l'affinità di un anticorpo per il suo target. Tali strategie includono, ma non in via limitativa, l'uso di mutagenesi sito-specifica o in modalità casuale della molecola polipeptidica codificante per un anticorpo per generare una variante anticorpale. In talune forme di realizzazione, tale generazione è seguita da screening per varianti anticorpali che esibiscono il cambiamento desiderato, ad esempio affinità aumentata o diminuita.

In talune forme di realizzazione, i residui amminoacidici target in strategie di mutagenesi sono quelli nelle CDR. In talune forme di realizzazione, amminoacidi nelle regioni framework dei domini variabili sono oggetto di target. In talune forme di realizzazione, tali regioni framework si sono dimostrate in grado di contribuire alle proprietà di legame target di taluni anticorpi. Si vedano, ad esempio, Hudson, Curr. Opin. Biotech., 9:395-402 (1999) e riferimenti ivi contenuti.

In talune forme di realizzazione, librerie più piccole e più efficacemente oggetto di screening di varianti anticorpali sono prodotte restringendo la mutagenesi random o sito diretta a siti di iper-mutazione nelle CDR, che sono siti che corrispondono ad aree propense alla mutazione durante il processo di maturazione dell'affinità somatica. Si vedano, ad esempio, Chowdhury & Pastan, Nature Biotech., 17: 568-572 (1999) e riferimenti ivi contenuti. In talune forme di realizzazione, certi tipi di elementi di DNA possono essere utilizzati per identificare siti di ipermutazione ivi inclusi, ma non in via limitativa, talune ripetizioni dirette e inverse, talune sequenze consenso, talune strutture secondarie e taluni palindromi. Ad esempio, tali elementi di DNA che possono essere utilizzati per identificare siti di ipermutazione includono, ma non in via limitativa, una sequenza tetrabasiica comprendente una purina (A o G), seguita da guanina (G), seguita da pirimidina (C o T), seguita da adenosina o timidina (A o T) (ossia, , A/G-G-C/T-A/T). Un altro esempio di elemento di DNA che può essere utilizzato per identificare siti di iper-mutazione è il codone della serina, A-G-C/T.

Preparazione di ABP interamente umane (ad esempio, anticorpi)

In talune forme di realizzazione, è utilizzata una tecnica di display fagico per generare anticorpi monoclonali. In talune forme di realizzazione, tali tecniche producono anticorpi monoclonali interamente umani. In talune forme di realizzazione, un polinucleotide codificante per un frammento anticorpale singolo Fab o Fv è espresso sulla superficie di una particella fagica. Si vedano, ad esempio, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J Mol Biol 222: 581 (1991); brevetto U.S. No. 5,885,793. In talune forme di realizzazione, i fagi sono "sottoposti a screening" per identificare quei frammenti anticorpali

avente affinità per il target. Così, alcuni di tali processi mimano la selezione immunitaria attraverso l'esibizione di repertori di frammento anticorpale sulla superficie di batteriofagi filamentosi e successiva selezione di fago tramite loro legame con il target. In alcune di tali procedure, sono isolati frammenti anticorpali neutralizzanti, funzionali, ad alta affinità. In alcune di tali forme di realizzazione (discusse in maggior dettaglio qui più avanti) un repertorio completo di geni di anticorpi umani è creato clonando geni V umani spontaneamente riarrangiati da linfociti di sangue periferico. Si veda, ad esempio, Mullinax et al., Proc Natl Acad Sci (USA), 87: 8095-8099 (1990).

Secondo talune forme di realizzazione, gli anticorpi dell'invenzione sono preparati attraverso l'uso di un topo transgenico che presenta una porzione sostanziale del genoma produttore anticorpo umano inserito, ma che è reso deficitario per la produzione di anticorpi endogeni, murini. Tali topi, quindi, sono in grado di produrre molecole immunoglobuliniche umane e anticorpi e sono deficitari della produzione di molecole immunoglobuliniche murine e anticorpi. Tecnologie utilizzate per ottenere questo risultato sono divulgate nei brevetti, domande e riferimenti divulgati nella descrizione qui trattata. In talune forme di realizzazione, è possibile impiegare metodi, quali quelli divulgati nella domanda pubblicata PCT No. WO 98/24893 o in Mendez et al., Nature Genetics, 15:146-156 (1997).

Generalmente, ABP monoclonali interamente umani (ad esempio, anticorpi) specifici per PCSK9 possono essere prodotti come segue. Topi transgenici contenenti geni delle immunoglobuline umane sono immunizzati con l'antigene di interesse, ad esempio PCSK9, cellule linfatiche (ad esempio, cellule B) sono ottenute da topi che esprimono anticorpi. Tali cellule recuperate sono fuse a una linea cellulare del tipo mieloide per preparare linee cellulari di ibridoma immortali, e tali linee cellulari di ibridoma sono sottoposte a screening e selezionate per identificare le linee cellulari di ibridoma che producono anticorpi specifici per l'antigene di interesse. In talune forme di realizzazione, è fornita la produzione di una linea cellulare di ibridoma che produce anticorpi specifici per PCSK9.

In talune forme di realizzazione, anticorpi interamente umani sono prodotti, esponendo splenociti umani (cellule B o T) a un antigene *in vitro* e poi ricostituendo le cellule esposte in un topo immunocompromesso, ad esempio SCID o nod/SCID. Si vedano, ad esempio, Brams et al., J.Immunol. 160: 2051-2058 (1998); Carballido et al., Nat. Med., 6: 103-106 (2000). In taluni di tali approcci, l'attecchimento di tessuto fetale umano in topi SCID (SCID-hu) risulta in una ematopoiesi a lungo termine e a sviluppo di cellule T umane. Si vedano, ad esempio, McCune et al., Science, 241:1532-1639 (1988); Ifversen et al., Sem. Immunol., 8:243-248 (1996). In alcuni casi, la risposta immunitaria umorale in tali topi

chimerici dipende dal co-sviluppo di cellule T umane negli animali. Si veda, ad esempio, Martensson et al., Immunol., 83:1271-179 (1994). In taluni approcci, linfociti di sangue periferico umano sono trasportati in topi SCID. Si veda, ad esempio, Mosier et al., Nature, 335:256-259 (1988). In alcune di tali forme di realizzazione, quando tali cellule trapiantate sono trattate con un agente di priming, quale enterotossina stafilococcica A (SEA) o con anticorpi monoclonali anti-CD40 umano, sono rilevati livelli maggiori di produzione di cellule B. Si vedano, ad esempio, Martensson et al., Immunol., 84: 224-230 (1995); Murphy et al., Blood, 86:1946-1953 (1995).

Così, in talune forme di realizzazione, anticorpi interamente umani possono essere prodotti tramite l'espressione di DNA ricombinante in cellule ospiti o espressione in cellule di ibridoma. In altre forme di realizzazione, gli anticorpi possono essere prodotti utilizzando le tecniche di display fagico qui descritte.

Gli anticorpi qui descritti sono stati preparati attraverso l'uso della tecnologia XenoMouse®, come qui descritto. Tali topi, quindi, sono in grado di produrre molecole immunoglobuliniche umane e anticorpi e sono deficitari della produzione di molecole immunoglobuliniche murine e anticorpi. Tecnologie utilizzate per ottenere lo stesso sono divulgate nei brevetti, nelle domande e nei riferimenti divulgati nella sezione dedicata allo stato dell'arte qui discussa. In particolare, tuttavia, una forma di realizzazione preferita di produzione transgenica di topi e anticorpi da essi è divulgata nella domanda di brevetto U.S. No. seriale 08/759,620, depositata il 3 dicembre 1996 e domande di brevetto internazionali No. WO 98/24893, Licata il 11 giugno 1998 e WO 00/76310, pubblicata il 21 dicembre 2000. Si veda, ad esempio, Mendez et al., Nature Genetics, 15:146-156 (1997).

Attraverso l'uso di tale tecnologia, sono stati prodotti anticorpi monoclonali interamente umani contro svariati antigeni. Essenzialmente, le linee XenoMouse® di topi sono immunizzati con un antigene di interesse (ad esempio, PCSK9), cellule linfatiche (quali cellule B) sono recuperate dai topi iper-immunizzati e i linfociti recuperati sono fusi a una linea cellulare di tipo mieloide per preparare linee cellulari di ibridoma immortali. Queste linee cellulari di ibridoma sono sottoposte a screening e selezionate per identificare linee cellulari di ibridoma che producevano anticorpi specifici per l'antigene di interesse. Sono qui forniti metodi per la produzione di linee cellulari multiple di ibridoma che producono anticorpi specifici per PCSK9. Inoltre, è qui fornita la caratterizzazione degli anticorpi prodotti da tali linee cellulari, ivi incluse le analisi di sequenza nucleotidica e amminoacidica delle catene pesanti e leggere di tali anticorpi.

La produzione dei ceppi XenoMouse® di topi è ulteriormente discussa e delineata nelle

domande di brevetto U.S. No. di serie 07/466,008, depositata il 12 gennaio 1990, 07/610,515, depositata il 8 novembre 1990, 07/919,297, depositata il 24 luglio 1992, 07/922,649, depositata il 30 luglio 1992, 08/031,801, depositata il 15 marzo 1993, 08/112,848, depositata il 27 agosto 1993, 08/234,145, depositata il 28 aprile 1994, 08/376,279, depositata il 20 gennaio 1995, 08/430, 938, depositata il 27 aprile 1995, 08/464,584, depositata il 5 giugno 1995, 08/464,582, depositata il depositata il 5 giugno 1995, 08/463,191, depositata il depositata il 5 giugno 1995, 08/462,837, depositata il depositata il 5 giugno 1995, 08/486,853, depositata il depositata il 5 giugno 1995, 08/486,857, depositata il depositata il 5 giugno 1995, 08/486,859, depositata il depositata il 5 giugno 1995, 08/462,513, depositata il depositata il 5 giugno 1995, 08/724,752, depositata il 2 ottobre 1996, 08/759,620, depositata il 3 dicembre 1996, pubblicazione U.S. 2003/0093820, depositata il 30 novembre 2001 e nei brevetti U.S. No. 6,162,963, 6,150,584, 6,114,598, 6,075,181 e 5,939,598 e nei brevetti giapponesi No. 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 e 3 068 507 B2. Si vedano anche il brevetto europeo No., EP 0 463 151 B1, pubblicazione concessa il 12 giugno 1996, domanda di brevetto internazionale No. WO 94/02602, pubblicata il 3 febbraio, 1994, domanda di brevetto internazionale No. WO 96/34096, pubblicata il 31 ottobre 1996, WO 98/24893, pubblicato il 11 giugno 1998, WO 00/76310, pubblicato il 21 dicembre 2000.

In un approccio alternativo, altri, ivi incluso GenPharm International, Inc., hanno utilizzato un approccio con "minilocus". Nell'approccio del minilocus, un locus di Ig esogeno è mimetizzato traverso l'inclusione di pezzi (geni individuali) dal locus Ig. Così, uno o più geni V_H , uno o più geni D_H , uno o più geni J_H , una regione costante μ e usualmente una seconda regione costante (preferibilmente una regione costante γ) sono formati in un costrutto per l'inserzione in un animale. questo approccio è descritto nel brevetto U.S. No. 5,545,807 assegnato a Surani et al. e nei brevetti U.S. No. 5,545,806, 5,625,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, 5,770,429, 5,789,650, 5,814,318, 5,877,397, 5,874,299, e 6,255,458 ciascuno assegnato a Lonberg & Kay, brevetto U.S. No. 5,591,669 e 6,023.010 assegnati a Krimpenfort & Berns, brevetti U.S. No. 5,612,205, 5,721,367, e 5,789,215 assegnato a Berns et al., e brevetto U.S. No. 5,643,763 assegnato a Choi & Dunn, e GenPharm International domande di brevetto U.S. No. seriale 07/574,748, depositato il 29 agosto 1990, 07/575,962, depositato il 31 agosto 1990, 07/810,279, depositato il 17 dicembre 1991, 07/853,408, depositato il 18 marzo 1992, 07/904,068, depositato il 12 giugno 1992, 07/990,860, depositato il 16 dicembre 1992, 08/053,131, depositato il 26 aprile 1993, 08/096,762, depositato il 22 luglio 1993, 08/155,301, depositato il 18 novembre 1993,



08/161,739, depositato il 3 dicembre 1993, 08/165,699, depositato il 10 dicembre 1993, 08/209,741, depositato il 9 marzo 1994. Si vedano, anche, il brevetto europeo No. 0 546 073 B1, le domande di brevetto internazionali No. WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852e WO 98/24884 e brevetto U.S. No. 5,981,175. Si vedano ulteriormente Taylor *et al.*, 1992, Chen *et al.*, 1993, Tuaillon *et al.*, 1993, Choi *et al.*, 1993, Lonberg *et al.*, (1994), Taylor *et al.*, (1994), e Tuaillon *et al.*, (1995), Fishwild *et al.*, (1996).

Kirin ha anche dimostrato la generazione di anticorpi umani da topi in cui, attraverso la fusione microcellulare, sono stati introdotti grandi pezzi di cromosomi o cromosomi interi. Si vedano, ad esempio, le domande di brevetto europeo No. 773 288 e 843 961. In più, sono state generati topi KMTM, che sono il risultato di incroci di topi Kirin Tc con topi minilocus di Medarex (Humab). Questi topi posseggono il transcromosoma IgH umano dei topi Kirin e il transgene della catena kappa dei topi Genpharm (Ishida *et al.*, Cloning Stem Cells, (2002) 4:91-102).

Anticorpi umani possono anche derivare da metodi *in vitro*. Esempi adatti includono, ma non in via limitativa, display fagico (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (precedentemente Proliferon), Affimed) display ribosomico (CAT), display di lievito e simili.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi qui descritti posseggono catene pesanti di IgG4 umani nonché catene pesanti di IgG2. Gli anticorpi possono anche essere di altri isotipi umani, ivi incluso IgG1. Gli anticorpi possedevano alte affinità, tipicamente possedendo una Kd da circa 10^{-6} a circa 10^{-13} M o minore, quando misurata con svariate tecniche.

Come sarà apprezzato, gli anticorpi possono essere espressi in linee cellulari differenti da linee cellulari di ibridoma. Sequenze codificanti per particolari anticorpi possono essere utilizzate per trasformare una cellula ospite di mammifero adatta. La trasformazione può avvenire con qualsiasi metodo noto per introdurre polinucleotidi in una cellula ospite, ivi inclusi, ad esempio, impacchettamento del nucleotide in un virus (o in un vettore virale) e trasduzione di una cellula ospite con il virus (o vettore) o mediante procedure di trasfezione note nell'arte, come esemplificato dai brevetti U.S. No. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 e 4,959,455. La procedura di trasformazione utilizzata dipende dall'ospite da trasformare. Metodi per introdurre polinucleotidi eterologhi in cellule di mammifero sono ben noti nell'arte e includono trasfezione mediata da destrano, precipitazione di fosfato di calcio, trasfezione mediata da polibrene, fusione di protoplasti, elettroporazione, incapsulazione del(i) polinucleotide(i) in liposomi e microiniezione diretta del DNA nei nuclei.

Linee cellulari di mammifero disponibili come ospiti per l'espressione sono ben noti nell'arte ed includono molte linee cellulari immortalizzate disponibili dalla American Type Culture Collection (ATCC), ivi inclusi, ma non in via limitativa, cellule di ovaio di criceto cinese (CHO), cellule HeLa, cellule di rene di criceto neonato (BHK), cellule di rene di scimmia (COS), cellule di carcinoma epatocellulare umano (ad esempio, Hep G2), cellule 293 di rene epiteliale umano e un numero di altre linee cellulari. Le linee cellulari di particolare preferenza sono selezionate determinando quali linee cellulari abbiano alti livelli di espressione e producano anticorpi con proteine di legame PCSK9 costitutive.

In talune forme di realizzazione, anticorpi e/o ABP sono prodotti da almeno uno dei seguenti ibridomi: 21B12, 31H4, 16F12, qualsiasi degli altri ibridomi elencati in Tabella 2 o divulgati negli Esempi. In talune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene si legano a PCSK9 con una costante di dissociazione (K_D) minore di approssimativamente 1 nM, ad esempio da 1000 pM a 100 pM, da 100 pM a 10 pM, da 10 pM a 1 pM e/o 1 pM a 0,1 pM o meno.

In talune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene comprendono: una molecola immunoglobulinica di almeno uno degli isotipi IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, Ig E, IgA, IgD e IgM. In talune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene comprendono una catena leggera kappa umana e/o una catena pesante umana. In talune forme di realizzazione, la catena pesante è di isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD o IgM. In talune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene sono state clonate per l'espressione in cellule di mammifero. In talune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene comprendono una regione costante differente da qualsiasi delle regioni costanti di isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD, e IgM.

In talune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene comprendono una catena leggera lamda umana e una catena pesante di IgG2 umana. In talune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene comprendono una catena leggera lamda umana e una catena pesante di IgG4 umana. In talune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene comprendono una catena leggera lambda umana e una catena pesante di IgG1, IgG3, IgE, IgA, IgD o IgM umana. In altre forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene comprendono una catena leggera kappa umana e una catena pesante di IgG2 umana. In talune forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene comprendono una catena leggera kappa umana e una catena pesante di IgG4 umana. In talune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene comprendono una catena leggera kappa umana e una catena pesante di IgG1, IgG3, IgE, IgA, IgD o IgM umana. In talune forme di realizzazione, le proteine leganti antigene comprendono regioni variabili di anticorpi ligati a una regione costante che non è

né la regione costante per l'isotipo IgG2 né la regione costante per l'isotipo IgG4. In talune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene sono state clonate per l'espressione in cellule di mammifero.

In talune forme di realizzazione, modificazioni conservative apportate alle catene pesanti e leggere di anticorpi da almeno una delle linee di ibridoma: 21B12, 31H4 e 16F12 (e corrispondenti modificazioni apportate ai nucleotidi codificanti) produrranno anticorpi contro PCSK9 aventi caratteristiche funzionali e chimiche simili a quelle degli anticorpi delle linee di ibridoma: 21B12, 31H4 e 16F12. Al contrario, in talune forme di realizzazione, modificazioni sostanziali delle caratteristiche funzionali e/o chimiche di anticorpi contro PCSK9 possono essere apportate, selezionando sostituzioni nella sequenza amminoacidica delle catene pesanti e leggere che differiscono significativamente nel loro effetto sul mantenimento della (a) struttura dello scheletro molecolare nell'area della sostituzione, ad esempio quale conformazione a foglietto o ad elica, (b) carica o idrofobicità della molecola nella sede target o (c) massa della catena laterale.

Ad esempio, una "sostituzione amminoacidica conservativa" può coinvolgere una sostituzione di un residuo amminoacidico nativo con un residuo non nativo tale che vi sia un effetto scarso o assente sulla polarità o carica del residuo amminoacidico in quella posizione. Inoltre, qualsiasi residuo nativo nel polipeptide può anche essere sostituito con alanina, come è stato precedentemente descritto per la "mutagenesi a scansione di alanina."

Sostituzioni amminoacidiche desiderate (siano esse conservative o non conservative) possono essere determinate dall'esperto del ramo al momento in cui tali sostituzioni sono desiderate. In talune forme di realizzazione, le sostituzioni amminoacidiche possono essere utilizzate per identificare importanti residui di anticorpi contro PCSK9 o per aumentare o diminuire l'affinità degli anticorpi alla PCSK9, come qui descritto.

In talune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione possono essere espressi in linee cellulari differenti dalle linee cellulari di ibridoma. In talune forme di realizzazione, le sequenze codificanti per particolari anticorpi possono essere utilizzate per la trasformazione di una adatta cellula ospite di mammifero. Secondo talune forme di realizzazione, la trasformazione può avvenire tramite qualsiasi metodo noto per l'introduzione di polinucleotidi in una cellula ospite, ivi inclusi, ad esempio, confezionamento del polinucleotide in un virus (o in un vettore virale) e traduzione di una cellula ospite con il virus (o vettore) o tramite procedure di trasfezione note nell'arte, come esemplificato dai brevetti U.S. No. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 e 4,959,455. In talune forme di realizzazione, la procedura di trasformazione utilizzata può dipendere dall'ospite

da trasformare. Metodi per l'introduzione di polinucleotidi eterologhi in cellule di mammifero sono ben noti nell'arte ed includono, ma non in via limitativa, trasfezione mediata da destrano, precipitazione di fosfato di calcio, trasfezione mediata da polibrene, fusione di protoplasti, elettroporazione, incapsulazione del(i) polinucleotide(i) in liposomi e microiniezione diretta del DNA nel nucleo.

Linee cellulari di mammifero disponibili come ospiti per l'espressione sono ben note nell'arte e includono, ma non in via limitativa, molte linee cellulari immortalizzate disponibili da American Type Culture Collection (ATCC), ivi inclusi, ma non in via limitativa, cellule di ovaio di criceto cinese (CHO), cellule HeLa, cellule di rene di criceto neonato (BHK), cellule di rene di scimmia (COS), cellule di carcinoma epatocellulare umano (ad esempio, Hep G2) e un certo numero di altre linee cellulari. In talune forme di realizzazione, le linee cellulari possono essere selezionate determinando quali linee cellulari abbiano alti livelli di espressione e producano anticorpi con proprietà leganti HGF costitutive. Appropriati vettori di espressione per cellule ospiti di mammifero sono ben noti. In talune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene comprendono: uno o più polipeptidi. In talune forme di realizzazione, può essere utilizzata qualsiasi di svariati sistemi vettore di espressione/ospite per esprimere molecole polinucleotidiche codificanti per polipeptidi comprendenti una o più componenti di ABP o la ABP stessa. Tali sistemi includono, ma non in via limitativa, microorganismi, quali batteri trasformati con vettori di espressione di DNA fondati su batteriofagi ricombinanti, plasmidi o cosmidi; lievito trasformato da vettori di espressione per lievito; sistemi di cellule di insetto infettati con vettori di espressione basati su virus (ad esempio, baculovirus); sistemi di cellule vegetali trasfettate con vettori di espressione basati su virus (ad esempio, virus del mosaico del cavolfiore, CaMV, virus del mosaico del tabacco, TMV) o trasformate con vettori di espressione batterici (ad esempio, plasmide Ti o pBR322); o sistemi di cellule animali.

In talune forme di realizzazione, un polipeptide, comprendente una o più componenti ABP o la ABP stessa è espresso in via ricombinante nel lievito. Alcune di tali forme di realizzazione utilizzano sistemi di espressione disponibili in commercio, ad esempio il sistema di espressione fondato su *Pichia* (Invitrogen, San Diego, CA), attenendosi alle istruzioni del produttore. In talune forme di realizzazione, un tale sistema si basa sulla sequenza pre-pro-alfa per dirigere la secrezione. In talune forme di realizzazione, la trascrizione dell'inserito è guidata dal promotore della alcol ossidasi (AOX1) dopo induzione tramite metanolo.

In talune forme di realizzazione, un polipeptide, comprendente una o più componenti della

ABP o la ABP stessa, è purificato da terreno di crescita per lievito. In talune forme di realizzazione, i metodi utilizzati per purificare un polipeptide da terreno di crescita per lievito sono gli stessi utilizzati per purificare il polipeptide da surnatanti batterici e di cellule di mammifero.

In talune forme di realizzazione, un acido nucleico codificante per un polipeptide comprendente una o più componenti di ABP o ABP stessa è clonato in un vettore di espressione fondato sul baculovirus, quale pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). In talune forme di realizzazione, tale vettore può essere utilizzato secondo le indicazioni del produttore (PharMingen) per infettare cellule di *Spodoptera frugiperda* in terreni privi di proteine sF9 e per produrre polipeptide ricombinante. In talune forme di realizzazione, un polipeptide è purificato e concentrato da tale terreno, utilizzando una colonna con eparina-sefariosio (Pharmacia).

In talune forme di realizzazione, un polipeptide, comprendente una o più componenti di ABP o la ABP stessa è espresso in un sistema di insetto. Taluni sistemi di insetto per l'espressione di polipeptidi sono ben noti all'esperto del ramo. In un tale sistema, il virus della poliedrosi nucleare *Autographa californica* (AcNPV) è utilizzato come vettore per esprimere geni estranei in cellule di *Spodoptera frugiperda* o in larve di *Trichoplusia*. In talune forme di realizzazione, una molecola di acido nucleico codificante per un polipeptide può essere inserita in un gene non essenziale del virus, ad esempio entro il gene della poliedrina, e posta sotto il controllo del promotore per quel gene. In talune forme di realizzazione, un'inserzione ben riuscita di una molecola di acido nucleico renderà il gene non essenziale inattivo. In talune forme di realizzazione, quella disattivazione risulta in una caratteristica rilevabile. Ad esempio, la disattivazione del gene della poliedrina risulta nella produzione di virus sprovvisto di proteina di rivestimento.

In talune forme di realizzazione, virus ricombinanti possono essere utilizzati per infettare cellule di *S. frugiperda* o larve di *Trichoplusia*. Si vedano, ad esempio, Smith et al., J. Virol., 46: 584 (1983); Engelhard et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 91: 3224-7 (1994).

In talune forme di realizzazione, polipeptidi comprendenti una o più componenti di ABP o la ABP stessa costituiti nelle cellule batteriche sono prodotti come corpi di inclusione insolubili nei batteri. In talune forme di realizzazione, le cellule ospiti comprendenti tali corpi di inclusione sono raccolte tramite centrifugazione; lavate in NaCl 0,15 M, Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM; e trattate con 0,1 mg/ml di lisozima (Sigma, St. Louis, MO) per 15 minuti a temperatura ambiente. In talune forme di realizzazione, il lisato è chiarificato mediante sonicazione e i detriti cellulari sono fatti sedimentare tramite centrifugazione per

10 minuti a 12000 X g. In talune forme di realizzazione, il sedimento contenente polipeptide è risospeso in Tris 50 mM, pH 8 e EDTA 10 mM; stratificato su glicerolo 50% e centrifugato per 30 minuti a 6000 X g. In talune forme di realizzazione, il sedimento può essere risospeso in tampone fosfato salino (PBS) standard, privo di Mg^{++} e Ca^{++} . In talune forme di realizzazione, il polipeptide è ulteriormente purificato mediante frazionamento del sedimento risospeso in un gel di poliacrilammide per SDS denaturante (si veda, ad esempio, Sambrook *et al.*, *supra*). In talune forme di realizzazione un tale gel può essere immerso in KCl 0,4 M per visualizzare la proteina che può essere scissa ed elettroeluita in SDS sprovvisto di tampone di corsa nel gel. Secondo talune forme di realizzazione, una proteina di fusione glutatione-S-transferasi (GST) è prodotta nei batteri come proteina solubile. In talune forme di realizzazione, tale proteina di fusione GST è purificata, utilizzando un modulo di purificazione di GST (Pharmacia).

In talune forme di realizzazione, è desiderabile "ripiegare" taluni polipeptidi, ad esempio polipeptidi comprendenti una o più componenti di ABP o la ABP stessa. In talune forme di realizzazione, tali polipeptidi sono prodotti, utilizzando taluni sistemi ricombinanti qui discussi. In talune forme di realizzazione, i polipeptidi sono "ripiegati" e/o ossidati per formare la struttura terziaria desiderata e/o generare collegamenti disolfuro. In talune forme di realizzazione, tale struttura e/o tali collegamenti sono correlati a una certa attività biologica di un polipeptide. In talune forme di realizzazione, il ripiegamento è portato a termine, utilizzando qualsiasi di un certo numero di procedure note nell'arte. Metodi esemplificativi includono, ma non in via limitativa, l'esposizione dell'agente polipeptidico solubilizzato a un pH tipicamente al di sopra di 7 in presenza di un agente caotropico. Un agente caotropico esemplificativo è la guanidina. In talune forme di realizzazione, la soluzione di ripiegamento/ossidazione contiene anche un agente riducente e la forma ossidata di quell'agente riducente. In talune forme di realizzazione, un agente riducente e la sua forma ossidata sono presenti in un rapporto che genererà un particolare potenziale di ossidoriduzione che consente il verificarsi di un rimescolamento del disolfuro. In talune forme di realizzazione, tale rimescolamento consente la formazione di ponti di cisteina. Coppie di ossidoriduzione esemplificative includono, ma non in via limitativa, cisteina/cistamina, glutatione/ditiobisGSH, cloruro cuprico, ditiotreitolo DTT/ditiano DTT e 2-mercaptoetanololo (bME)/ditio-bME. In talune forme di realizzazione, un co-solvente è utilizzato per incrementare l'efficienza di ripiegamento. Co-solventi esemplificativi includono, ma non in via limitativa, glicerolo, glicole polietilenico di vari pesi molecolari e arginina.

In talune forme di realizzazione, si purifica sostanzialmente un polipeptide comprendente una o più componenti di ABP o la ABP stessa. Talune tecniche di purificazione delle proteine sono note all'esperto del ramo. In talune forme di realizzazione, la purificazione delle proteine coinvolge il frazionamento grezzo di frazionamenti polipeptidici da frazioni non polipeptidiche. In talune forme di realizzazione, i polipeptidi sono purificati, utilizzando tecniche cromatografiche e/o elettroforetiche. Metodi di purificazione esemplificativi includono, ma non in via limitativa, precipitazione con solfato di ammonio, precipitazione con PEG; immunoprecipitazione; denaturazione a caldo, seguita da centrifugazione; cromatografia, ivi inclusi, ma non in via limitativa, cromatografia per affinità (ad esempio, proteina A-sefariosio), cromatografia a scambio ionico, cromatografia di esclusione e cromatografia a fase inversa; gel filtrazione; cromatografia con idrossiapatite; isoelettrofocalizzazione; elettroforesi su gel di poliacrilammide; e combinazioni di tali e altre tecniche. In talune forme di realizzazione, un polipeptide è purificato mediante cromatografia liquida di proteine veloci o mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). In talune forme di realizzazione, le fasi di purificazione possono essere cambiate o talune fasi possono essere omesse, pur tuttavia mantenendosi un metodo adatto per la preparazione di un polipeptide sostanzialmente purificato.

In talune forme di realizzazione, si quantifica il grado di purificazione di una preparazione polipeptidica. Taluni metodi per quantificare il grado di purificazione sono noti all'esperto del ramo. Taluni metodi esemplificativi includono, ma non in via limitativa, la determinazione dell'attività di legame specifica della preparazione e la valutazione della quantità di un polipeptide all'interno di una preparazione tramite analisi SDS/PAGE. Taluni metodi esemplificativi per la valutazione della quantità di purificazione di una preparazione polipeptidica comprendono il calcolo dell'attività di legame di una preparazione e confrontando questa attività con l'attività di legame di un estratto iniziale. In talune forme di realizzazione, i risultati di un tale calcolo sono espressi come "purificazione moltiplicativa". Le unità utilizzate per rappresentare la quantità di attività di legame dipendono dal particolare saggio effettuato.

In talune forme di realizzazione, si purifica parzialmente un polipeptide comprendente una o più componenti di ABP o la ABP stessa. In talune forme di realizzazione, la purificazione parziale può essere condotta, utilizzando un minor numero di fasi di purificazione o utilizzando forme differenti dello stesso schema generale di purificazione. Ad esempio, in talune forme di realizzazione, la cromatografia su colonna a scambio cationico, effettuata utilizzando un apparato HPLC, risulterà generalmente in una "purificazione moltiplicativa"

maggiore rispetto alla stessa tecnica che utilizza un sistema di cromatografia a bassa pressione. In talune forme di realizzazione, i metodi risultanti in un grado inferiore di purificazione possono trarre vantaggi dal recupero totale del polipeptide o dal mantenimento dell'attività di legame di un polipeptide.

In talune forme di realizzazione, la migrazione elettroforetica di un polipeptide può variare, talvolta significativamente, per differenti condizioni di SDS/PAGE. Si veda, ad esempio, Capaldi et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 76: 425 (1977). Sarà apprezzato che in differenti condizioni di elettroforesi, i pesi molecolari apparenti di un polipeptide purificato o parzialmente purificato possano essere differenti.

Epitopi esemplificativi

Sono forniti epitopi ai quali si leghino anticorpi anti-PCSK9. In alcune forme di realizzazione, gli epitopi che sono legati dagli anticorpi qui divulgati sono particolarmente utili. In alcune forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene che si legano a qualsiasi degli epitopi che sono legati dagli anticorpi qui descritti sono utili. In alcune forme di realizzazione, gli epitopi legati da qualsiasi degli anticorpi elencati in Tabella 2 e nelle FIGG. 2 e 3 sono in special modo utili. In alcune forme di realizzazione, l'epitopo è sul dominio catalitico di PCSK9.

In talune forme di realizzazione, un epitopo di PCSK9 può essere utilizzato per impedire (ad esempio, ridurre) il legame di un anticorpo anti-PCSK9 o di una proteina legante l'antigene a PCSK9. In talune forme di realizzazione, un epitopo di PCSK9 può essere utilizzato per indurre una diminuzione del legame di un anticorpo anti-PCSK9 o di una proteina legante l'antigene a PCSK9. In talune forme di realizzazione, un epitopo di PCSK9 può essere utilizzato per inibire sostanzialmente il legame di un anticorpo anti-PCSK9 o di una proteina legante l'antigene a PCSK9.

In talune forme di realizzazione, un epitopo di PCSK9 può essere utilizzato per isolare anticorpi o proteine leganti l'antigene che si legano a PCSK9. In talune forme di realizzazione, un epitopo di PCSK9 può essere utilizzato per generare anticorpi o proteine leganti l'antigene che si legano a PCSK9. In talune forme di realizzazione, un epitopo di PCSK9 o una sequenza comprendente un epitopo di PCSK9 può essere utilizzato/a quale immunogeno per generare anticorpi o proteine leganti l'antigene che si legano a PCSK9. In talune forme di realizzazione, un epitopo di PCSK9 può essere somministrato a un animale e gli anticorpi che si legano a PCSK9 possono essere successivamente ottenuti dall'animale. In talune forme di realizzazione, un epitopo di PCSK9 o una sequenza comprendente un epitopo di PCSK9 può essere utilizzato/a per interferire con la normale attività mediata da

PCSK9, quale un'associazione di PCSK9 con LDLR.

In alcune forme di realizzazione, proteine leganti l'antigene qui divulgate si legano specificamente a un prodominio N-terminale, a un dominio catalitico simile alla subtilisina e/o a un dominio C terminale. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene si lega al solco legante il substrato di PCSK-9 (descritto in Cunningham et al.).

In alcune forme di realizzazione, il(i) dominio(i)/la(e) regione(i) contenenti i residui che sono in contatto con o sono celati da un anticorpo possono essere identificati tramite mutazione di specifici residui in PCSK9 (ad esempio, un antigene di tipo selvatico) e determinando, se la proteina legante l'antigene possa legarsi alla proteina PCSK9 mutata o variante. Realizzando numerose mutazioni singole, è possibile identificare i residui che svolgono un ruolo diretto nel legame o che sono sufficientemente a stretta prossimità dell'anticorpo in modo tale che una mutazione possa incidere sul legame tra la proteina legante l'antigene e l'antigene. Da una conoscenza di questi amminoacidi, è possibile chiarire l'uno o più domini o l'una o più regioni dell'antigene che contengono residui a contatto con la proteina legante l'antigene o coperti dall'anticorpo. Un tale dominio può includere l'epitopo legante di una proteina legante l'antigene. Un esempio specifico di questo approccio generale utilizza un protocollo di scanning di arginina/acido glutammico (si veda, ad esempio, Nanevicz, T., et al., 1995, J. Biol. Chem., 270:37, 21619-21625 e Zupnick, A., et al., 2006, J. Biol. Chem., 281:29, 20464-20473). In generale, arginina e acidi glutammici vengono sostituiti (tipicamente singolarmente) per un amminoacido nel polipeptide di tipo selvatico poiché questi amminoacidi sono carichi e ingombranti e hanno pertanto il potenziale di interrompere il legame tra la proteina legante l'antigene e un antigene nella regione dell'antigene dove viene introdotta la mutazione. Le arginine che esistono nell'antigene di tipo selvatico vengono sostituite con acido glutammico. Viene ottenuta una varietà di tali singoli mutanti e i risultati di legame raccolti vengono analizzati per determinare quali residui incidono sul legame.

Un'alterazione (ad esempio una riduzione un incremento) del legame fra una proteina legante l'antigene e una PCSK9 variante, come qui utilizzata, indica che vi è un cambiamento dell'affinità di legame (ad esempio come misurato mediante metodi noti, quali test Biacore o il saggio basato sulle biglie descritto qui più avanti negli esempi), EC50, e/o un cambiamento (ad esempio, una riduzione) della capacità di legame totale della proteina legante l'antigene (ad esempio come evidenziato da una diminuzione di Bmax in una rappresentazione grafica della concentrazione di proteine leganti l'antigene vs concentrazione di antigene). Una alterazione significativa del legame indica che il residuo

mutato è direttamente coinvolto nel legame alla proteina legante l'antigene o è in stretta prossimità alla proteina legante, quando la proteina legante è legata all'antigene.

In alcune forme di realizzazione, una riduzione significativa nel legame indica che l'affinità di legame, EC50, e/o la capacità fra una proteina legante l'antigene e un antigene PCSK9 mutante siano/sia ridotte/e per più del 10%, più del 20%, più del 40%, più del 50%, più del 55%, più del 60%, più del 65%, più del 70%, più del 75%, più dell'80%, più dell'85%, più del 90% o più del 95% relativamente al legame fra la proteina legante l'antigene e una PCSK9 di tipo selvatico (ad esempio, come mostrato in SEQ ID NO: 1 e/o SEQ ID NO: (303)). In determinate forme di realizzazione, il legame viene ridotto al di sotto di limiti rilevabili. In alcune forme di realizzazione, una riduzione significativa del legame è evidenziata, quando il legame di una proteina legante l'antigene a una proteina PCSK9 variante è minore del 50% (ad esempio, minore del 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% o 10%) del legame osservato fra la proteina legante l'antigene e una proteina PCSK9 di tipo selvatico (ad esempio, la proteina di SEQ ID NO: 1 e/o SEQ ID NO: (303)). Tali misurazioni di legame possono essere realizzate usando una varietà di saggi di legame noti nell'arte.

In alcune forme di realizzazione, sono fornite proteine leganti l'antigene che esibiscono un legame significativamente minore per una proteina PCSK9 variante in cui un residuo nella proteina PCSK9 di tipo selvatico (ad esempio, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303 è sostituito con arginina o acido glutammico. In alcune forme di realizzazione, il legame di una proteina legante l'antigene è significativamente ridotto o aumentato per una proteina PCSK9 variante avente qualsiasi una o più (ad esempio, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 244) delle seguenti mutazioni: R207E, D208R, R185E, R439E, E513R, V538R, E539R, T132R, S351R, A390R, A413R, E582R, D162R, R164E, E167R, S123R, E129R, A311R, D313R, D337R, R519E, H521R e Q554R a confronto con una proteina PCSK9 di tipo selvatico (ad esempio, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303). Nella notazione abbreviata usata qui, il formato è: Residuo wild-type: Posizione nel polipeptide: Residuo mutante, con la numerazione dei residui come indicato in SEQ ID N°: 1 o SEQ ID NO: 303.

In alcune forme di realizzazione, il legame di una proteina legante l'antigene è significativamente ridotto o aumentato per una proteina PCSK9 mutante avente qualsiasi una o più (ad esempio, 1, 2, 3, 4, 5 o più) mutazioni in corrispondenza delle seguenti posizioni: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 e 554, come mostrato in SEQ ID NO: 1 a confronto con una proteina PCSK9 di tipo selvatico (ad esempio, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303). In alcune forme di realizzazione, il legame di una proteina legante l'antigene è ridotto o

aumentato per una proteina PCSK9 mutante avente una o più (ad esempio, 1, 2, 3, 4, 5 o più) mutazioni in corrispondenza delle seguenti posizioni: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 e 554, come mostrato in SEQ ID NO: 1 a confronto con una proteina PCSK9 di tipo selvatico (ad esempio, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303). In alcune forme di realizzazione, il legame di una proteina legante l'antigene è sostanzialmente ridotto o aumentato per una proteina PCSK9 mutante avente una o più (ad esempio, 1, 2, 3, 4, 5 o più) mutazioni in corrispondenza delle seguenti posizioni: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 e 554, entro SEQ ID NO: 1 a confronto con una proteina PCSK9 di tipo selvatico (ad esempio, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303).

In alcune forme di realizzazione, il legame di una ABP è significativamente ridotto o aumentato per una proteina PCSK9 mutante avente una o più (ad esempio, 1, 2, 3, 4, 5, ecc.) delle seguenti mutazioni: R207E, D208R, R185E, R439E, E513R, V538R, E539R, T132R, S351R, A390R, A413R, E582R, D162R, R164E, E167R, S123R, E129R, A311R, D313R, D337R, R519E, H521R e Q554R entro SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303 a confronto con una proteina PCSK9 di tipo selvatico (ad esempio, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303).

In alcune forme di realizzazione, il legame di una ABP è significativamente ridotto o aumentato per una proteina PCSK9 mutante avente una o più (ad esempio, 1, 2, 3, 4, 5, ecc.) delle seguenti mutazioni: R207E, D208R, R185E, R439E, E513R, V538R, E539R, T132R, S351R, A390R, A413R e E582R entro SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303 a confronto con una proteina PCSK9 di tipo selvatico (ad esempio, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303). In alcune forme di realizzazione, il legame è ridotto. In alcune forme di realizzazione, la riduzione del legame si osserva come cambiamento di EC50. In alcune forme di realizzazione, il cambiamento di EC50 è un aumento del valore numerico di EC50 (e, così, è una diminuzione del legame).

In alcune forme di realizzazione, il legame di una ABP è significativamente ridotto o aumentato per una proteina PCSK9 mutante avente una o più (ad esempio, 1, 2, 3, 4, 5, ecc.) delle seguenti mutazioni: D162R, R164E, E167R, S123R, E129R, A311R, D313R, D337R, R519E, H521R e Q554R entro SEQ ID NO: 1 a confronto con una proteina PCSK9 di tipo selvatico (ad esempio, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303). In alcune forme di realizzazione, il legame è ridotto. In alcune forme di realizzazione, la riduzione del legame si osserva come cambiamento di Bmax. In alcune forme di realizzazione, lo spostamento di Bmax è una riduzione del massimo segnale generato dalla ABP. In alcune forme di realizzazione, perché un amminoacido sia parte di un epitopo, Bmax è ridotto di almeno il 10%, ad esempio,

riduzioni di almeno qualsiasi delle seguenti quantità: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100 percento può, in alcune forme di realizzazione, indicare che il residuo è parte dell'epitopo.

Sebbene le forme varianti appena elencate siano riferite rispetto alla sequenza di tipo selvatico mostrata in SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303, si apprezzerà che in una variante allelica di PCSK9 l'amminoacido in corrispondenza della posizione indicata possa differire. Sono altresì contemplate proteine leganti l'antigene che mostrano un legame significativamente inferiore per tali forme alleliche di PCSK9. Di conseguenza, in alcune forme di realizzazione, qualsiasi delle forme di realizzazione sopra discusse può essere confrontata con una sequenza allelica piuttosto che puramente con la sequenza di tipo selvatico mostrata in FIG. 1A

In alcune forme di realizzazione, il legame di una proteina legante l'antigene è significativamente ridotto per una proteina PCSK9 variante in cui il residuo in corrispondenza di una posizione selezionata nella proteina PCSK9 di tipo selvatico è mutato in qualsiasi altro residuo. In alcune forme di realizzazione, le sostituzioni qui descritte che coinvolgono arginina/acido glutammico sono utilizzate per le posizioni identificate. In alcune forme di realizzazione, alanina è utilizzata per le posizioni identificate.

Come sopra fatto notare, i residui direttamente coinvolti nel legame o coperti da una proteina legante l'antigene possono essere identificati dai risultati di scanning. Questi residui possono, così, fornire un'indicazione dei domini o delle regioni di SEQ ID NO: 1 (o SEQ ID NO: 303 o SEQ ID NO: 3) che contengono la(e) regione(i) alla(e) quale(i) si legano le proteine leganti l'antigene. Come si può osservare dai risultati riassunti nell'Esempio 39, in alcune forme di realizzazione una proteina legante l'antigene si lega a un dominio contenente almeno uno degli amminoacidi: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 e 554 di SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene si lega a una regione contenente almeno uno degli amminoacidi 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 e 554 di SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303.

In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene si lega a una regione contenente almeno uno degli amminoacidi 162, 164, 167, 207 e/o 208 of SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303. In alcune forme di realizzazione, più di uno (ad esempio, 2, 3, 4, o 5) dei residui identificati sono parte della regione che è legata dalla ABP. In alcune forme di realizzazione, ABP compete con ABP 21B12.

In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene si lega a una regione contenente almeno uno degli amminoacidi 185 di SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303. In alcune forme di realizzazione, ABP compete con ABP 31H4.

In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene si lega a una regione contenente almeno uno degli amminoacidi 439, 513, 538 e/o 539 di SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303. In alcune forme di realizzazione, più di uno (ad esempio, 2, 3, o 4) dei residui identificati sono parte della regione che è legata dalla ABP. In alcune forme di realizzazione, ABP compete con ABP 31A4.

In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene si lega a una regione contenente almeno uno degli amminoacidi 123, 129, 311, 313, 337, 132, 351, 390 e/o 413 di SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303. In alcune forme di realizzazione, più di uno (ad esempio, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9) dei residui identificati sono parte della regione che è legata dalla ABP. In alcune forme di realizzazione, ABP compete con ABP 12H11.

In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene si lega a una regione contenente almeno uno degli amminoacidi 582, 519, 521 e/o 554 di SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303. In alcune forme di realizzazione, più di uno (ad esempio, 2, 3, o 4) dei residui identificati sono parte della regione che è legata dalla ABP. In alcune forme di realizzazione, ABP compete con ABP 3C4.

In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene si lega alle regioni precedenti entro un frammento della sequenza di lunghezza intera di SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303. In altre forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene si legano a polipeptidi consistenti di queste regioni. il riferimento a "SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 303" denota che una o entrambe queste sequenze può/possono essere impiegata/e o pertinente/i. La frase non denota che ne debba essere impiegata soltanto una.

Come sopra fatto notare, i riferimenti della descrizione sopra riportata specificano posizioni amminoacidiche in riferimento a SEQ ID NO: 1. Tuttavia, nello svolgersi dell'intera descrizione, è generalmente fatto riferimento a un dominio Pro/Cat che comincia in posizione 31, che è fornito in SEQ ID NO: 3. Come sopra fatto notare, SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 303 sono sprovviste della sequenza di segnale di PCSK9. Come tale, qualsiasi confronto fra queste varie divulgazioni dovrà tenere conto di questa differenza nella numerazione. In particolare, qualsiasi posizione amminoacidica in SEQ ID NO: 1, corrisponderà a una posizione amminoacidica 30 amminoacidi più in là nella proteina in SEQ ID NO: 3. Ad esempio, la posizione 207 di SEQ ID NO: 1 corrisponde alla posizione 237 di SEQ ID NO: 3 (la sequenza di lunghezza intera e il sistema di numerazione utilizzato

nella presente specificazione in generale). La Tabella 39.6 evidenzia come le posizioni fatte sopra notare, che si riferiscono a SEQ ID NO: 1 (e/o SEQ ID NO: 303) corrispondono a SEQ ID NO: 3 (che include la sequenza di segnale). Così, qualsiasi delle forme di realizzazione sopra fatte notare, che sono descritte a riguardo della SEQ ID NO: 1 (e/o SEQ ID NO: 303), sono descritte in riferimento a SEQ ID NO: 3, tramite le posizioni corrispondenti annotate. In alcune forme di realizzazione, ABP 21B12 si lega a un epitopo che include i residui 162-167 (ad esempio, i residui D162-E167 di SEQ ID NO: 1). In alcune forme di realizzazione, ABP 12H11 si lega a un epitopo che include i residui 123-132 (ad esempio, S123-T132 di SEQ ID NO: 1). In alcune forme di realizzazione, ABP 12H11 si lega a un epitopo che include i residui 311-313 (ad esempio, A311-D313 di SEQ ID NO: 1). In alcune forme di realizzazione, ABP può legarsi a un epitopo che include uno qualsiasi di questi tratti di sequenze

Proteine leganti l'antigene di competizione

In un altro aspetto, sono fornite proteine leganti l'antigene che competono con uno degli anticorpi esemplificati o frammenti funzionali che si legano all'epitopo qui descritto per il legame specifico a PCSK9. Tali proteine leganti l'antigene possono altresì legarsi allo stesso epitopo di una delle proteine leganti l'antigene qui esemplificate o a un epitopo sovrapposto. Ci si attende che le proteine leganti l'antigene e i frammenti che competono con o si legano allo stesso epitopo delle proteine leganti l'antigene esemplificate mostrino proprietà funzionali analoghe. Le proteine e i frammenti leganti l'antigene esemplificati includono quelli sopra descritti, ivi inclusi quelli con le catene pesanti e leggere, domini di regione variabile e CDR inclusi in Tabella 2 e/o FIGG. 2-3. Così, quale esempio specifico, le proteine leganti l'antigene fornite includono quelle che competono con un anticorpo o una proteina legante l'antigene avente:

- (a) tutte 6 le CDR elencate, per un anticorpo elencato nelle FIGG. 2-3;
- b) una VH e una VL elencate, per un anticorpo elencato in Tabella 2; o
- c) due catene leggere e due catene pesanti come specificato per un anticorpo elencato in Tabella 2.

Formulazioni farmaceutiche terapeutiche e somministrazione

Sono qui divulgate formulazioni farmaceutiche contenenti proteine leganti l'antigene contro PCSK9. Come qui utilizzato, "formulazione farmaceutica" è una composizione sterile di un farmaco attivo dal punto di vista farmaceutico, vale a dire almeno una proteina legante l'antigene contro PCSK9, che sia adatto alla somministrazione parenterale (ivi incluse, ma non in via limitativa, endovenosa, intramuscolare, sottocutanea, per aerosol, intrapolmonare,

intrasale o intratecale) a un paziente che ne necessiti e includa soltanto eccipienti, diluenti e altri additivi accettabili dal punto di vista farmaceutico ritenuti sicuri dalla Federal Drug Administration o da altre autorità di altre nazioni. Le formulazioni farmaceutiche includono soluzioni liquide, ad esempio acquose, che possono essere direttamente somministrate e polveri liofilizzate che possono essere ricostituite in soluzioni dall'aggiunta di un diluente subito prima della somministrazione. Specificamente escluse dall'ambito del termine "formulazione farmaceutica" vi sono composizioni per la somministrazione topica a pazienti, composizioni per l'ingestione orale e composizioni per il nutrimento parenterale. In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica è una formulazione farmaceutica stabile. Come qui utilizzate, le frasi "formulazione farmaceutica stabile", "formulazione stabile" o "una forma farmaceutica è stabile" si riferiscono a una formulazione farmaceutica di proteine biologicamente attive che esibiscono una aumentata aggregazione e/o una ridotta perdita di attività biologica di non più del 5%, quando stoccate a 2-8°C per almeno 1 mese o 2 mesi o 3 mesi o 6 mesi o 1 anno o 2 anni a confronto con un campione di formula di controllo. La stabilità delle formulazioni può essere facilmente determinata da un esperto del ramo, utilizzando qualsiasi numero di saggi standard, ivi inclusi, ma non in via limitativa, HPLC a esclusione dimensionale ("SEC-HPLC"), HPLC a scambio cationico (CEX-HPLC), rilevamento di particelle subvisibili tramite oscuramento della luce ("HIAC") e/o ispezione visiva.

In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende qualsiasi delle proteine leganti l'antigene contro PCSK9 illustrate in Tabella 2 e FIGG. 2 e/o 3 e nelle FIGG. 48A e 48B. In talune altre forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica può comprendere altre proteine leganti l'antigene contro PCSK9; vale a dire, un anticorpo costituito da un dominio variabile di catena leggera, SEQ ID NO:588 e un dominio variabile di catena pesante, SEQ ID NO:589. In alcune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende uno qualsiasi di 21B12, 26H5, 31H4, 8A3, 11F1 o 8A1.

In alcune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende più di una differente proteina legante l'antigene contro PCSK9. In talune forme di realizzazione, le formulazioni farmaceutiche comprendono più di una proteina legante l'antigene contro PCSK9 in cui le proteine leganti l'antigene contro PCSK9 si legano a più di un epitopo. In alcune forme di realizzazione, le varie proteine leganti l'antigene non competeranno fra loro per il legame a PCSK9. In alcune forme di realizzazione, qualsiasi delle proteine leganti l'antigene illustrate in Tabella 2 e FIGG. 2 e/o 3 possono essere combinate insieme in una formulazione farmaceutica.

In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 e/o una molecola terapeutica sono/è collegate/a a un veicolo che prolunga l'emivita noto nell'arte. Tali veicoli includono, ma non in via limitativa, glicole polietilenico, glicogeno (ad esempio, glicosilazione della ABP) e destrano. Tali veicoli sono descritti, ad esempio, nella domanda U.S. No. seriale 09/428,082, ora brevetto US No. 6,660,843 e nella domanda PCT No. WO 99/25044 pubblicata.

In determinate forme di realizzazione vengono impiegati materiali di formulazione accettabile che sono atossici per i riceventi ai dosaggi e alle concentrazioni impiegati. In alcune forme di realizzazione, il o i materiali di formulazione sono per somministrazione s.c. e/o E.V. In talune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica può contenere materiali di formulazione per modificare, mantenere o conservare, ad esempio, il pH, osmolarità, viscosità, trasparenza, colore, isotonicità, odore, sterilità, stabilità, velocità di dissoluzione o rilascio, assorbimento o penetrazione della composizione.

In talune forme di realizzazione, materiali di formulazione adatti includono, ma non in via limitativa, amminoacidi (quali prolina, arginina, lisina, metionina, taurina, glicina, glutammina o asparagina); antimicrobici, antiossidanti (quali acido ascorbico, solfito di sodio, o sodio idrogeno solfito); tamponi (quali borato, bicarbonato, fosfato di sodio ("NaOAC"), Tris-HCl, tampone Tris, citrati, tampone fosfato, tampone fosfato salino (ossia, tampone PBS) o altri acidi organici); agenti di carica (quali mannitolo o glicina), agenti chelanti (quali acido etilendiamminotetracetico (EDTA)); agenti complessanti (quali caffeina, polivinilpirrolidone, beta-ciclodestrina o idrossipropil-beta-ciclodestrina); riempitivi, monosaccaridi; disaccaridi; e altri carboidrati (quali glucosio, saccarosio, fruttosio, lattosio, mannosio, trealosio o destrine); proteine (quali albumina sierica, gelatina, o immunoglobuline); agenti coloranti, aromatizzanti e diluenti; agenti emulsionanti; polimeri idrofilici (quali polivinilpirrolidone); polipeptidi a basso peso molecolare; controioni formanti sali (quali sodio); conservanti (quali cloruro di benزالconio, acido benzoico, acido salicilico, timerosal, alcol fenetilico, metilparabene, propilparabene, clorexidina, acido sorbico o perossido di idrogeno); solventi (quali glicerina, glicole propilenico o glicole polietilenico); alcoli di zuccheri (quali mannitolo o sorbitolo); agenti di sospensione; tensioattivi o agenti umettanti (quali pluronici; PEG; esteri del sorbitano, polisorbati, quali polisorbato 20, polisorbato 80, triton, trometamina, lecitina, colesterolo o tiloxapolo); agenti potenzianti la stabilità (quali saccarosio o sorbitolo); agenti potenzianti la tonicità (quali alogenuri di metalli alcalini, preferibilmente cloruro di sodio o potassio, mannitolo sorbitolo); veicoli di erogazione; diluenti; eccipienti e/o adiuvanti farmaceutici.

(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995).

In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica ottimale verrà determinata da un esperto del ramo a seconda, ad esempio, di via di somministrazione prevista, formato di rilascio e dosaggio desiderato. Si veda, ad esempio, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, di cui sopra. In talune forme di realizzazione, tali formulazioni possono influenzare stato fisico, stabilità, velocità di rilascio *in vivo* e velocità di clearance *in vivo* degli anticorpi dell'invenzione.

In un aspetto, la formulazione farmaceutica comprende alte concentrazioni di proteina legante l'antigene contro PCSK9. In talune forme di realizzazione, la concentrazione di ABP varia da circa 70 mg/ml a circa 250 mg/ml, ad esempio circa 70 mg/ml, circa 80 mg/ml, circa 90 mg/ml, circa 100 mg/ml, circa 100 mg/ml, circa 120 mg/ml, circa 130 mg/ml, circa 140 mg/ml, circa 150 mg/ml, circa 160 mg/ml, circa 170 mg/ml, circa 180 mg/ml, circa 190 mg/ml, circa 200 mg/ml, circa 210 mg/ml, circa 220 mg/ml, circa 230 mg/ml, circa 240 mg/ml o circa 250 mg/ml, includendo tutti i valori ivi frammezzo. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di 21B12, 26H5 o 31H4 varia da circa 100 mg/ml a circa 150 mg/ml, ad esempio, 100 mg/ml e circa 100 mg/ml, circa 120 mg/ml, circa 130 mg/ml, circa 140 mg/ml o circa 150 mg/ml. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di 8A3, 11F1 o 8A1 varia da circa 140 mg/ml a circa 220 mg/ml, ad esempio 140 mg/ml, circa 150 mg/ml, circa 160 mg/ml, circa 170 mg/ml, circa 180 mg/ml, circa 190 mg/ml, circa 200 mg/ml, circa 210 mg/ml, circa 220 mg/ml o circa 250 mg/ml.

In un altro aspetto, la formulazione farmaceutica comprende almeno un agente tampone, quale, ad esempio, acetato di sodio, cloruro di sodio, fosfati, tampone fosfato salino ("PBS") e/o tampone Tris di circa pH 7,0-8,5. Il tampone serve a mantenere un pH adatto dal punto di vista fisiologico. In più, il tampone può servire a potenziare l'isotonicità e la stabilità chimica della formulazione farmaceutica. In talune forme di realizzazione, l'agente tampone varia da circa 0,05 mM a circa 40 mM, ad esempio agente tampone circa 0,05 mM, circa 0,1 mM, circa 0,5 mM, circa 1,0 mM, circa 5,0 mM, circa 10 mM, circa 15 mM, circa 20 mM, circa 30 mM, circa 40 mM, circa 50 mM, circa 60 mM, circa 70 mM, circa 80 mM, circa 90 mM o circa 100 mM, inclusi tutti i valori ivi frammezzo. In talune forme di realizzazione, l'agente tampone è NaOAC. PH esemplificativi della formulazione farmaceutica includono da circa 4 a circa 6 o da circa 4,8 a circa 5,8 o da circa 5,0 a circa 5,2 o circa 5 o circa 5,2.

In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica è isotonica con una osmolalità che varia da circa 250 a circa 350 miliosmoli/kg, ad esempio circa 250 mOsm/kg, circa 260

mOsm/kg, circa 270 mOsm/kg, circa 280 mOsm/kg, circa 290 mOsm/kg, circa 300 mOsm/kg, circa 310 mOsm/kg, circa 320 mOsm/kg, circa 330 mOsm/kg, circa 340 mOsm/kg o circa 350 mOsm/kg, inclusi tutti i valori ivi frammezzo. Come qui utilizzato, "osmolalità" è la misura del rapporto fra soluti e volume del liquido. In altre parole, è il numero di molecole e ioni (o molecole) per kilogrammo di soluzione. L'osmolalità può essere misurata su uno strumento analitico chiamato osmometro, quale osmometro per più campioni Advanced Instruments 2020, Norwood, MA. L'osmometro Advanced Instruments 2020 Multi-sample misura l'osmolarità, utilizzando il metodo dell'abbassamento crioscopico. Quanti più saranno gli osmoliti in soluzione, tanto più la temperatura alla quale la soluzione congelerà scende. L'osmolalità può essere misurata, utilizzando qualsiasi altro metodo e in qualsiasi altra unità noti nell'arte, quali estrapolazione lineare.

In un altro aspetto ancora, la formulazione farmaceutica comprende almeno un tensioattivo che include, ma non in via limitativa, polisorbato-80, polisorbato-60, polisorbato-40 e polisorbato-20. In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende un tensioattivo a una concentrazione che varia da circa 0,004% a circa 10% in peso sul volume ("p/v") della formulazione, ad esempio circa 0,004%, circa 0,005%, circa 0,006%, circa 0,007%, circa 0,008%, circa 0,009%, circa 0,01%, circa 0,05%, circa 0,1%, circa 0,5%, circa 1%, circa 5% o circa 10% di tensioattivo p/v della formulazione. In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende polisorbato 80 a una concentrazione che varia da circa 0,004% a circa 0,1% della formulazione. In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende polisorbato 20 a una concentrazione che varia da circa 0,004% a circa 0,1% della formulazione.

In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende almeno un agente stabilizzante, quale idrocarburo poliidrossi (ivi inclusi, ma non in via limitativa, sorbitolo, mannitolo, glicerolo e dulcitol) e/o un disaccaride (ivi inclusi, ma non in via limitativa, saccarosio, lattosio, maltosio e trealosio) e/o un amminoacido (ivi inclusi, ma non in via limitativa, prolina, arginina, lisina, metionina e taurina) e/o alcol benzilico; il totale di detti idrocarburo poliidrossi e/o di saccaride e/o amminoacido e/o alcol benzilico essendo da circa 0,5% a circa 10% p/v della formulazione. In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende un agente stabilizzante a una concentrazione di circa 1%, circa 2%, circa 3%, circa 4%, circa 5%, circa 6%, circa 7%, circa 8%, circa 9% o circa 10% di saccarosio. In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende un agente stabilizzante a una concentrazione di circa 5% di saccarosio. In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende un agente stabilizzante a una

concentrazione di circa 1%, circa 2%, circa 3%, circa 4%, circa 5%, circa 6%, circa 7%, circa 8%, circa 9% o circa 10% di sorbitolo. In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende un agente stabilizzante a una concentrazione di circa 9% di sorbitolo. In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende un agente stabilizzante a una concentrazione di circa 1%, circa 2%, circa 3%, circa 4%, circa 5% di prolina, arginina, lisina, metionina e/o taurina. In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende un agente stabilizzante ha una concentrazione di circa 2-3% di prolina. In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende un agente stabilizzante a una concentrazione di circa 1%, circa 2%, circa 3%, circa 4%, circa 5% di alcol benzilico. In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende un agente stabilizzante a una concentrazione di circa 1-2% di alcol benzilico.

In un aspetto, la formulazione farmaceutica presenta un livello di viscosità inferiore a circa 30 centipoise (cP), così come misurato a temperatura ambiente (ossia, 25°C). Come qui utilizzato, "viscosità" è la resistenza di un fluido a scorrere e può essere misurata in unità di centipoise (cP) o milliPascal-secondo (mPa-s), dove 1 cP = 1 mPa-s, per una data velocità di taglio. La viscosità può essere misurata, utilizzando un viscosimetro, ad esempio viscosimetro Brookfield Engineering Dial Reading Viscometer, modello LVT. La viscosità può anche essere misurata, utilizzando qualsiasi altro metodo e in qualsiasi altra unità noti nell'arte (ad esempio, viscosità assoluta, cinematica o dinamica o viscosità assoluta). In talune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica presenta un livello di viscosità inferiore a circa 25 cP, circa 20 cP, circa 18 cP, circa 15 cP, circa 12 cP, circa 10 cP; circa 8 cP, circa 6 cP, circa 4 cP; circa 2 cP; o circa 1 cP.

In un aspetto, la formulazione farmaceutica è stabile, così come viene misurata mediante almeno un saggio di stabilità noto a un esperto del ramo, quali i saggi che esaminano le caratteristiche biofisiche o biochimiche di proteine biologicamente attive nel tempo. Come sopra menzionato, una formulazione farmaceutica stabile è una formulazione farmaceutica di proteine biologicamente attive che esibisce una aumentata aggregazione e/o una ridotta perdita di attività biologica non più del 5%, quando stoccata a 2-8°C per almeno 1 mese o 2 mesi o 3 mesi o 6 mesi o 1 anno o 2 anni a confronto con un campione di formula di controllo. In talune forme di realizzazione, la stabilità della formulazione farmaceutica è misurata, utilizzando HPLC a esclusione dimensionale ("SEC-HPLC"). SEC-HPLC separa le proteine sulla base di differenze dei loro volumi idrodinamici. Molecole con volumi di proteine idrodinamici più grandi eluiscono prima di molecole con volumi più piccoli. Nel caso di SEC-HPLC, una formulazione farmaceutica stabile deve esibire un aumento di specie ad

alto peso molecolare non più di circa il 5% a confronto con un campione di controllo. In talune altre forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica deve esibire un aumento di specie ad alto peso molecolare non più di circa il 4%, non più di circa il 3%, non più di circa il 2%, non più di circa l'1%, non più di circa lo 0,5% a confronto con un campione di controllo.

In talune forme di realizzazione, la stabilità della formulazione farmaceutica è misurata, utilizzando HPLC a scambio cationico (CEX-HPLC). CEX-HPLC separa proteine sulla base di differenze della loro carica di superficie. A un pH impostato, le isoforme cariche di una ABP anti-PCSK9 sono separate su una colonna a scambio cationico ed eluite, utilizzando un gradiente di sale. L'eluente è monitorato tramite assorbanza UV. La distribuzione delle isoforme cariche è valutata, determinando l'area di picco di ciascuna isoforma quale percentuale dell'area totale di picco. Nel caso di CEX-HPLC, una formulazione farmaceutica stabile deve esibire una diminuzione del picco principale delle isoforme non più di circa il 5% a confronto con un campione di controllo. In talune altre forme di realizzazione, una formulazione farmaceutica stabile deve esibire una riduzione del picco principale delle isoforme da non più di circa il 3% a circa 5% a confronto con un campione di controllo. In talune altre forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica deve esibire una riduzione del picco principale delle isoforme non più di circa il 4%, non più di circa il 3%, non più di circa il 2%, non più di circa l'1%, non più di circa lo 0,5% a confronto con un campione di controllo.

In talune forme di realizzazione, la stabilità della formulazione farmaceutica è misurata, utilizzando rilevazione di particelle subvisibili mediante oscuramento della luce ("HIAC"). Un sistema di conteggio delle particelle di origine liquida elettronico (HIAC/Royco 9703 o equivalente), contenente un sensore di oscuramento della luce (HIAC/Royco HRLD-150 o equivalente) con un campionatore di liquidi, quantifica numero di particelle e il loro intervallo dimensionale in un dato campione in esame. Quando le particelle in un liquido passano fra la sorgente luminosa e il rilevatore, esse riducono od "oscurano" il fascio di luce che cade sul rilevatore. Quando la concentrazione di particelle ricade all'interno dell'intervallo normale del sensore, queste particelle sono rilevate una ad una. Il passaggio di ciascuna particella attraverso la zona di rilevamento riduce la luce incidente sul fotorilevatore e la tensione in uscita del fotorilevatore è momentaneamente ridotta. I cambiamenti di tensione si registrano come impulsi elettrici che sono convertiti dallo strumento nel numero di particelle presenti. Il metodo è aspecifico e misura le particelle indipendentemente dalla loro origine. Le dimensioni particellari monitorate sono

generalmente 10 μm e 25 μm . Nel caso di HIAC, una formulazione farmaceutica stabile deve esibire non più di 6000 particelle di 10 μm per contenitore (o unità) a confronto con un campione di controllo. In talune forme di realizzazione, una formulazione farmaceutica stabile deve esibire non più di 5000, non più di 4000, non più di 3000, non più di 2000, non più di 1000, particelle di 10 μm per contenitore (o unità) a confronto con un campione di controllo. In altre forme di realizzazione ancora, una formulazione farmaceutica stabile deve esibire non più di 600 particelle di 25 μm per contenitore (o unità) a confronto con un campione di controllo. In talune forme di realizzazione, una formulazione farmaceutica stabile deve esibire non più di 500, non più di 400, non più di 300, non più di 200, non più di 100, non più di 50 particelle di 25 μm per contenitore (o unità) a confronto con un campione di controllo.

In talune forme di realizzazione, la stabilità della formulazione farmaceutica è misurata, utilizzando una valutazione visiva. La valutazione visiva è un metodo qualitativo, utilizzato per descrivere le caratteristiche fisiche visibili di un campione. Il campione è visionato contro lo sfondo nero e/o bianco di un banco di ispezione, a seconda delle caratteristiche che vengono valutate (ad esempio, colore, limpidezza, presenza di particelle o materia estranea). I campioni sono anche visionati contro uno standard di riferimento opalescente e standard di riferimento a colori. Nel caso di una valutazione visiva, una formulazione farmaceutica stabile deve esibire nessun cambiamento significativo di colore, limpidezza, presenza di particelle o materia estranea a confronto con un campione di controllo.

Un aspetto è una formulazione farmaceutica che comprende: (i) da circa 70 mg/ml a circa 250 mg/ml di proteina legante l'antigene per PCSK9; (ii) un tampone, quale acetato di sodio ("NaOAC") da circa 0,05 mM a circa 40 mM che serve da agente tampone; (iii) da circa 1% a circa 5% di prolina, arginina, lisina, metionina o taurina (anche nota come acido 2-amminoetansolfonico) e/o da 0,5% a circa 5% di alcool benzilico che serve da agente stabilizzante; e (iv) da circa 0,004% a circa 10% p/v della formulazione di un tensioattivo non-ionico (ivi inclusi, ma non in via limitativa, polisorbato-80, polisorbato-60, polisorbato-40 e polisorbato-20); in cui detta formulazione ha un pH nell'intervallo di circa da 4,0 a 6,0. In talune altre forme di realizzazione, le formulazioni farmaceutiche comprendono (i) almeno circa 70 mg/ml, circa 100 mg/ml, circa 120 mg/ml, circa 140 mg/ml, circa 150 mg/ml, circa 160 mg/ml, circa 170 mg/ml, circa 180 mg/ml, circa 190 mg/ml, circa 200 mg/ml di un anticorpo anti-PCSK9; (ii) NAOAC circa 10 mM; (iii) circa 0,01% di polisorbato 80; e (iv) circa 2%-3% di prolina (o prolina da circa 250 mM a circa 270 mM), in cui la formulazione ha un pH di circa 5. In talune altre forme di realizzazione, le

formulazioni farmaceutiche comprendono (i) almeno circa 70 mg/ml, circa 100 mg/ml, circa 120 mg/ml, circa 140 mg/ml dell'anticorpo anti-PCSK9, 21B12, 26H5 e/o 31H4; (ii) NAOAC circa 10 mM; (iii) circa 0,01% di polisorbato 80; e (iv) circa 2%-3% di prolina (o prolina da circa 250 mM a circa 270 mM), in cui la formulazione ha un pH di circa 5. In talune altre forme di realizzazione, le formulazioni farmaceutiche comprendono (i) almeno circa 150 mg/ml, circa 160 mg/ml, circa 170 mg/ml, circa 180 mg/ml, circa 190 mg/ml, circa 200 mg/ml dell'anticorpo anti-PCSK9, 8A3, 11F1 e/o 8A1; (ii) NAOAC circa 10 mM; (iii) circa 0,01% di polisorbato 80; e (iv) circa 2%-3% di prolina (o prolina da circa 250 mM a circa 270 mM), in cui la formulazione ha un pH di circa 5.

Un aspetto è una formulazione farmaceutica che comprende (i) almeno da circa 70 mg/ml a circa 250 mg/ml di un anticorpo anti-PCSK9; (ii) un tampone da circa 5 mM a circa 20 mM, quale NAOAC; (iii) da circa 1% a circa 10% p/v della formulazione comprende un idrocarburo poliidrossi, quale sorbitolo o un disaccaride, quale saccarosio; e (iv) da circa 0,004% a circa 10% p/v della formulazione di un tensioattivo, quale polisorbato 20 o polisorbato 80; in cui detta formulazione ha un pH nell'intervallo di circa da 4,8 a 5,8; e in cui la formulazione farmaceutica facoltativamente comprende prolina, arginina, lisina, metionina o taurina da circa 80 mM a circa 300 mM e/o da 0,5% a circa 5% di alcol benzilico che serve a ridurre la viscosità. In talune altre forme di realizzazione, le formulazioni farmaceutiche comprendono (i) almeno da circa 70 mg/ml a circa 250 mg/ml dell'anticorpo anti-PCSK9; (ii) NAOAC circa 10 mM; (iii) saccarosio circa 9%; e (iv) polisorbato 20 circa 0,004%, in cui la formulazione ha un pH di circa 5,2. In talune altre forme di realizzazione, le formulazioni farmaceutiche comprendono (i) almeno circa 70 mg/ml, circa 100 mg/ml, circa 120 mg/ml, circa 140 mg/ml, circa 160 mg/ml, circa 180 mg/ml, circa 200 mg/ml di un anticorpo anti-PCSK9; (ii) NAOAC circa 15 mM; (iii) saccarosio circa 9%; e (iv) polisorbato 20 circa 0,01%, in cui la formulazione ha un pH di circa 5,2. In talune altre forme di realizzazione, le formulazioni farmaceutiche comprendono (i) almeno circa 70 mg/ml, circa 100 mg/ml, circa 120 mg/ml, circa 140 mg/ml, circa 160 mg/ml, circa 180 mg/ml, circa 200 mg/ml di un anticorpo anti-PCSK9; (ii) NAOAC circa 20 mM; (iii) saccarosio circa 9%; e (iv) polisorbato 20 circa 0,01%, in cui la formulazione ha un pH di circa 5,2. In talune altre forme di realizzazione, le formulazioni farmaceutiche comprendono (i) almeno circa 70 mg/ml, circa 100 mg/ml, circa 120 mg/ml, circa 140 mg/ml, circa 160 mg/ml, circa 180 mg/ml, circa 200 mg/ml di un anticorpo anti-PCSK9; (ii) NAOAC circa 10 mM; (iii) saccarosio circa 9%; (iv) polisorbato 80 circa 0,01%; e (v) prolina circa 250 mM, in cui la formulazione ha un pH di circa 5.

Le formulazioni farmaceutiche possono essere somministrate in politerapia, ossia combinate con altri agenti. In talune forme di realizzazione, la politerapia comprende una proteina legante l'antigene in grado di legarsi a PCSK9, in combinazione con almeno un agente anticolsterolo. Agenti includono, ma non in via limitativa, formulazioni chimiche preparate per via sintetica, anticorpi, regioni leganti l'antigene e loro combinazioni e coniugati. In talune forme di realizzazione, un agente può agire da agonista, antagonista modulatore allosterico o tossina. In talune forme di realizzazione, un agente può agire per inibire o stimolare il suo target (ad esempio, attivazione o inibizione di recettore o enzima) e promuovere in tal modo un'espressione aumentata di LDLR o ridurre i livelli sierici di colesterolo.

In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 può essere somministrata prima di, in concomitanza con e successivamente a un trattamento con un agente ipocolesterolemizzante (attivo sul colesterolo sierico e/o totale). In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 può essere somministrata per profilassi per impedire o mitigare l'instaurarsi di ipercolesterolemia, malattia cardiaca, diabete e/o qualsiasi dei disturbi correlati al colesterolo. In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 può essere somministrata per il trattamento di una condizione di ipercolesterolemia preesistente. In alcune forme di realizzazione, la ABP ritarda la comparsa del disturbo e/o dei sintomi associati al disturbo. In alcune forme di realizzazione, la ABP è fornita a un soggetto che non riferisce alcun sintomo di uno qualsiasi dei disturbi correlati al colesterolo o di un suo sottogruppo.

In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 è utilizzata con particolari agenti terapeutici per trattare vari disturbi correlati al colesterolo, quali ipercolesterolemia. In talune forme di realizzazione, alla luce della condizione e del livello desiderato di trattamento, possono essere somministrati due, tre o più agenti. In talune forme di realizzazione, tali agenti possono essere forniti insieme tramite inclusione nella stessa formulazione. In talune forme di realizzazione, tali uno o più agenti e una proteina legante l'antigene contro PCSK9 possono essere forniti insieme tramite inclusione nella stessa formulazione. In talune forme di realizzazione, tali agenti possono essere formulati separatamente e forniti insieme tramite inclusione in un kit di trattamento. In talune forme di realizzazione, tali agenti e una proteina legante l'antigene contro PCSK9 possono essere formulati separatamente e forniti insieme tramite inclusione in un kit di trattamento. In talune forme di realizzazione, tali agenti possono essere forniti separatamente.

In talune forme di realizzazione, una formulazione comprendente una proteina legante

l'antigene contro PCSK9 con o senza almeno un agente terapeutico aggiuntivo, può essere preparata per lo stoccaggio, miscelando la formulazione selezionata avente il grado desiderato di purezza con agenti di formulazione facoltativi (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) sotto forma di una torta di filtrazione liofilizzata o soluzione acquosa. Inoltre, in talune forme di realizzazione, una formulazione comprendente una proteina legante l'antigene contro PCSK9 con o senza almeno un agente terapeutico aggiuntivo, può essere formulata quale liofilizzato, utilizzando eccipienti appropriati.

In talune forme di realizzazione, quando è contemplata la somministrazione parenterale, una formulazione terapeutica può essere sotto forma di una soluzione acquosa priva di pirogeni, accettabile per via parenterale, comprendente una proteina legante l'antigene contro PCSK9 desiderata, con o senza agenti terapeutici aggiuntivi, in un veicolo accettabile dal punto di vista farmaceutico. In talune forme di realizzazione, un veicolo per iniezione parenterale è acqua distillata sterile, in cui una proteina legante l'antigene contro PCSK9 con o senza almeno un agente terapeutico aggiuntivo, è formulata come soluzione isotonica sterile, adeguatamente conservata. In talune forme di realizzazione, la preparazione può coinvolgere la formulazione della molecola desiderata con un agente, quali microsfele iniettabili, particelle bioerodibili, composti polimerici (quale acido polilattico o acido poliglicolico), sferette o liposomi, che possono fornire il rilascio controllato o prolungato del prodotto che può essere quindi erogato attraverso un'iniezione depot. In talune forme di realizzazione, può essere usato anche acido ialuronico, il quale può avere l'effetto di promuovere la durata prolungata nella circolazione. In talune forme di realizzazione, dispositivi di erogazione di farmaci impiantabili possono essere utilizzati per introdurre la molecola desiderata.

In talune forme di realizzazione, una formulazione farmaceutica può essere formulata per inalazione. In talune forme di realizzazione, una proteina legante antigene contro PCSK9 con o senza almeno un agente terapeutico aggiuntivo, può essere formulata come una polvere secca per inalazione. In talune forme di realizzazione, una soluzione per inalazione comprendente una proteina legante l'antigene contro PCSK9 con o senza almeno un agente terapeutico aggiuntivo può essere formulata con un propellente per erogazione di aerosol. In talune forme di realizzazione, le soluzioni possono essere nebulizzate. La somministrazione polmonare è ulteriormente descritta nella domanda PCT PCT/US94/001875, che descrive l'erogazione a livello polmonare di proteine chimicamente modificate.

In talune forme di realizzazione, una composizione farmaceutica può coinvolgere una quantità efficace di una proteina legante l'antigene contro PCSK9 con o senza almeno un agente terapeutico aggiuntivo, in una miscela con eccipienti non tossici che sono adatti alla

manifattura di compresse. In talune forme di realizzazione, dissolvendo le compresse in acqua sterile o in un altro veicolo appropriato, le soluzioni possono essere preparate in forma farmaceutica unitaria. In talune forme di realizzazione, eccipienti adatti includono, ma non in via limitativa, diluenti inerti, quali carbonato di calcio, carbonato o bicarbonato di sodio, lattosio o fosfato di calcio; o agenti leganti quali amido, gelatina o acacia; o agenti lubrificanti quali stearato di magnesio, acido stearico o talco.

Composizioni farmaceutiche aggiuntive appariranno evidenti all'esperto del ramo e includono formulazioni che coinvolgono una proteina legante l'antigene contro PCSK9, con o senza almeno uno o più agenti terapeutici aggiuntivi, in formulazioni ad erogazione prolungata o controllata. In talune forme di realizzazione, tecniche per formulare svariati mezzi di erogazione prolungata o controllata, quali veicolanti liposomici, microparticelle bioerodibili o sferette porose e iniezioni depot, sono inoltre note all'esperto del ramo. Si veda, ad esempio, la domanda PCT No. PCT/US93/00829 che descrive il rilascio controllato di microparticelle polimeriche porose per l'erogazione di formulazioni farmaceutiche. In certe forme di realizzazione, preparazioni per il rilascio prolungato possono includere matrici polimeriche semipermeabili sotto forma di articoli modellati, ad esempio, pellicole o microcapsule. Matrici a rilascio sostenuto possono includere poliesteri, idrogel, polilattidi (U.S. 3,773,919 e EP 058,481), copolimeri di acido glutammico e gamma etil L-glutammato (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22:547-556 (1983)), poli (2-idrossietil-metacrilato) (Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277 (1981) e Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105 (1982)), etilene vinil acetato (Langer *et al.*, *supra*) o acido poli-D (-) -3-idrossibutirrico (EP 133,988). In talune forme di realizzazione, formulazioni a rilascio prolungato possono anche includere liposomi, che possono essere preparati con qualsiasi di numerosi metodi noti nell'arte. *Si vedano, ad esempio*, Eppstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692 (1985); EP 036,676; EP 088,046 e EP 143,949.

La formulazione farmaceutica da utilizzare per la somministrazione *in vivo* è tipicamente sterile. In talune forme di realizzazione, questa si può ottenere mediante filtrazione attraverso membrane per filtrazione sterili. In talune forme di realizzazione, dove la formulazione è liofilizzata, la sterilizzazione con l'uso di questo metodo può essere condotta prima della o successivamente alla liofilizzazione e ricostituzione. In talune forme di realizzazione, la formulazione per somministrazione parenterale può essere stoccata in forma liofilizzata o in una soluzione. In talune forme di realizzazione, le formulazioni parenterali sono poste generalmente in un contenitore avente un'apertura di accesso sterile, ad esempio, una sacca o flaconcino di soluzione endovenosa avente un tappo perforabile mediante un ago per

iniezione ipodermica.

In talune forme di realizzazione, una volta che la formulazione farmaceutica è stata formulata, essa può essere stoccata in flaconcini sterili come soluzione, sospensione, gel, emulsione, solido o come polvere disidratata o liofilizzata. In talune forme di realizzazione, tali formulazioni possono essere stoccate in forma pronta all'uso o in una forma (ad esempio, liofilizzata) che è ricostituita prima della somministrazione.

In talune forme di realizzazione, una volta che la formulazione farmaceutica è stata formulata, essa può essere stoccata in siringhe preriempite come soluzione o sospensione in forma pronta all'uso.

In talune forme di realizzazione, sono forniti kit per produrre un'unità di somministrazione a dose singola. In talune forme di realizzazione, il kit può contenere sia un primo contenitore avente una proteina essiccata sia un secondo contenitore avente una formulazione acquosa. In talune forme di realizzazione, sono inclusi kit contenenti siringhe pre-riempite a singola camera o multicamera (ad esempio, siringhe liquide e liosiringhe).

In talune forme di realizzazione, la quantità efficace di una formulazione farmaceutica comprendente una proteina legante l'antigene diretta a PCSK9, con o senza almeno un agente terapeutico aggiuntivo, da impiegare dal punto di vista terapeutico dipenderà, ad esempio, dal contesto e dagli scopi terapeutici. L'esperto del ramo apprezzerà che i livelli di dosaggio appropriati per il trattamento, secondo talune forme di realizzazione, varieranno, in parte, in base alla molecola erogata, all'indicazione per cui viene usata una proteina legante l'antigene contro PCSK9, con o senza almeno un agente terapeutico aggiuntivo, alla via di somministrazione e alla stazza (peso corporeo, superficie corporea o dimensione dell'organo) e/o condizione (età e stato di salute generale) del paziente. In certe forme di realizzazione, il medico può titolare il dosaggio e modificare la via di somministrazione per ottenere l'effetto terapeutico ottimale.

In talune forme di realizzazione, la composizione può essere somministrata localmente attraverso l'impianto di una membrana, spugna o un altro materiale appropriato sul quale la molecola desiderata è stata assorbita o incapsulata. In talune forme di realizzazione, laddove si usi un dispositivo per impianto, il dispositivo può essere impiantato in qualsiasi tessuto od organo adatto e l'erogazione della molecola desiderata può avvenire mediante diffusione, bolo a rilascio temporizzato o somministrazione continua.

Dosaggio e regimi di dosaggio

Qualsiasi delle proteine leganti l'antigene contro PCSK9 illustrate in Tabella 2 e FIGG. 2 e/o 3 e/o FIG.48A e 48B possono essere somministrate a un paziente secondo i metodi qui

descritti. In alcune forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene contro PCSK9 includono 21B12, 26H5, 31H4, 8A3, 11F1 o 8A1.

La quantità di proteina legante l'antigene contro PCSK9 (ad esempio, un anticorpo anti-PCSK9) somministrata a un paziente secondo la presente invenzione è, generalmente, una quantità efficace dal punto di vista terapeutico. La quantità di ABP può essere espressa in termini di milligrammi di anticorpo (ossia, mg) o milligrammi di anticorpo per chilogrammo di peso corporeo del paziente (ossia, mg/kg). In talune forme di realizzazione, un dosaggio tipico di una proteina legante l'antigene contro PCSK9 può variare da circa 0,1 µg/kg sino a circa 100 mg/kg o più di proteina legante l'antigene contro PCSK9. In talune forme di realizzazione, il dosaggio può variare da 0,1 µg/kg sino a circa 100 mg/kg; o 1 µg/kg sino a circa 100 mg/kg; o 5 µg/kg sino a circa 100 mg/kg di proteina legante antigene contro PCSK9; o da 1 mg/kg a circa 50 mg/kg di proteina legante l'antigene contro PCSK9; o da 2 mg/kg a circa 20 mg/kg di proteina legante l'antigene contro PCSK9; o da 2 mg/kg a circa 10 mg/kg di proteina legante l'antigene contro PCSK9.

In talune forme di realizzazione, la quantità (o dose) di proteina legante l'antigene per PCSK9 può variare da almeno circa 10 mg a circa 1400mg; o da circa 14 mg a circa 1200 mg; o da circa 14 mg a circa 1000 mg; o da circa 14 mg a circa 800 mg; o da circa 14 mg a circa 700 mg; o da circa 14 mg a circa 480 mg; o da circa 20 mg sino a circa 480 mg; o da circa 70 mg sino a circa 480 mg; o da circa 80 mg a circa 480 mg; o da circa 90 mg a circa 480 mg; o da circa 100 mg a circa 480 mg, o da circa 105 mg a circa 480 mg; o da circa 110 mg a circa 480 mg; o da circa 115 mg a circa 480 mg; o da circa 120 mg a circa 480 mg; o da circa 125 mg a circa 480 mg; o da circa 130 mg a circa 480 mg; o da circa 135 mg a circa 480 mg; o da circa 140 mg a circa 480 mg; o da circa 145 mg a circa 480 mg; o da circa 150 mg a circa 480 mg; o da circa 160 mg a circa 480 mg; o da circa 170 mg a circa 480 mg; o da circa 180 mg a circa 480 mg o da circa 190 mg a circa 480 mg o da circa 200 mg a circa 480 mg; o da circa 210 mg a circa 480 mg; o da circa 220 mg a circa 480 mg; o da circa 230 mg a circa 480 mg; o da circa 240 mg a circa 480 mg; o da circa 250 mg a circa 480 mg; o da circa 260 mg a circa 480 mg; o da circa 270 mg a circa 480 mg; o da circa 280 mg a circa 480 mg; o da circa 290 mg a circa 480 mg; o da circa 300 mg a circa 480 mg; o da circa 310 mg a circa 480 mg; o da circa 320 mg a circa 480 mg; o da circa 330 mg a circa 480 mg; o da circa 340 mg a circa 480 mg; o da circa 350 mg a circa 480 mg; o da circa 360 mg a circa 480 mg; o da circa 370 mg a circa 480 mg; o da circa 380 mg a circa 480 mg; o da circa 390 mg a circa 480 mg; o da circa 400 mg a circa 480 mg; o da circa 410 mg a circa 480 mg; o da circa 420 mg a circa 480 mg; o da circa 430 mg a circa 480 mg; o da circa 440 mg a circa

480 mg; o da circa 450 mg a circa 480 mg; o da circa 460 mg a circa 480 mg; o da circa 470 mg a circa 480 mg di proteina legante l'antigene per PCSK9.

In talune forme di realizzazione, la frequenza di dosaggio terrà conto dei parametri farmacocinetici di una proteina legante l'antigene contro PCSK9 e/o di qualsiasi agente terapeutico aggiuntivo nella formulazione utilizzata. In talune forme di realizzazione, un medico somministrerà la composizione fino al raggiungimento di un dosaggio che ottenga l'effetto desiderato. In talune forme di realizzazione, la formulazione può pertanto essere somministrata come dose singola o come due, tre, quattro o più dosi (che possono o possono non contenere la stessa quantità della molecola desiderata) nel tempo come un'infusione continua tramite un dispositivo di impianto o catetere. La formulazione può anche essere erogata per via sottocutanea o endovenosa con ago e siringa standard. In più, rispetto all'erogazione sottocutanea, dispositivi di erogazione a penna nonché dispositivi di erogazione autoiniettivi hanno applicazioni nell'erogare una formulazione farmaceutica qui descritta. Ulteriore affinamento del dosaggio appropriato è fatto di routine dal tecnico del ramo e rientra nell'ambito di attività che svolge di routine. In talune forme di realizzazione, dosaggi appropriati possono essere accertati attraverso l'uso di appropriati dati di dose-risposta. In alcune forme di realizzazione, la quantità e la frequenza di somministrazione possono tenere conto del livello desiderato di colesterolo (sierico e/o totale) da ottenere e del livello di colesterolo, livello di LDL e/o livelli di LDRL effettivi nel soggetto, tutti i quali possono essere ottenuti con metodi che sono ben noti all'esperto del ramo.

In talune forme di realizzazione, una dose di almeno circa 10 mg; o sino a circa 14 mg; o sino a circa 20 mg; o sino a circa 35 mg; o sino a circa 40 mg, o sino a circa 45 mg, o sino a circa 50 mg; o sino a circa 70 mg di una proteina legante l'antigene contro PCSK9 è somministrata una volta alla settimana (QW) a un paziente che ne necessiti.

In alcune altre forme di realizzazione, una dose di almeno circa 70 mg, o sino a circa 100 mg; o sino a circa 105 mg, o sino a circa 110 mg; o sino a circa 115 mg, o sino a circa 120 mg; o sino a circa 140 mg; o sino a circa 160 mg; o sino a circa 200 mg; o sino a circa 250 mg; o sino a 280 mg; o sino a 300 mg; o sino a 350 mg; o sino a 400 mg; o sino a 420 mg di una proteina legante l'antigene contro PCSK9 è somministrata una volta a settimane alterne (o ogni due settimane)(Q2W), a un paziente che ne necessiti.

In talune altre forme di realizzazione, una dose di almeno circa 250 mg; o sino a circa 280 mg; o sino a circa 300 mg; o sino a circa 350 mg; o sino a circa 400 mg; o sino a circa 420 mg; o sino a circa 450 mg; o sino a 480 mg di una proteina legante l'antigene contro PCSK9 è somministrata una volta ogni quattro settimane (o una volta al mese), a un paziente che ne

necessiti.

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 15% a confronto con un livello sierico pre-dose di colesterolo LDL. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 20%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 25%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 30%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 40%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 50%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 55%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 60%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 65%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 70%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 75%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa dell'80%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa dell'85%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 90%.

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 15%, a confronto con un livello sierico pre-dose di colesterolo LDL e la riduzione si prolunga per un periodo di almeno circa 3 giorni, almeno circa 5 giorni, almeno circa 7 giorni, almeno circa 10 giorni, almeno circa 14 giorni, almeno circa 21 giorni, almeno circa 25 giorni, almeno circa 28 giorni o almeno circa 31 giorni rispetto a un livello pre-dose.

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 20%, a confronto con un livello sierico pre-dose di colesterolo LDL e la riduzione si prolunga per un periodo di almeno circa 3 giorni, almeno circa 5 giorni, almeno circa 7 giorni, almeno circa 10 giorni, almeno circa 14 giorni, almeno circa 21 giorni, almeno circa 25 giorni, almeno circa 28 giorni o almeno circa 31 giorni rispetto a un livello pre-dose.

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 25%, a confronto con un livello sierico pre-dose di colesterolo LDL e la riduzione si prolunga per un periodo di almeno circa 3 giorni, almeno circa 5 giorni, almeno circa 7 giorni, almeno circa 10 giorni, almeno circa 14 giorni, almeno circa 21 giorni, almeno circa 25 giorni, almeno circa 28 giorni o almeno circa 31 giorni rispetto a un livello pre-dose.

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 65%, a confronto con un livello sierico pre-dose di colesterolo LDL e la riduzione si prolunga per un periodo di almeno circa 3 giorni, almeno circa 5 giorni, almeno circa 7 giorni, almeno circa 10 giorni, almeno circa 14 giorni, almeno circa 21 giorni, almeno circa 25 giorni, almeno circa 28 giorni o almeno circa 31 giorni rispetto a un livello pre-dose.

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 70%, a confronto con un livello sierico pre-dose di colesterolo LDL e la riduzione si prolunga per un periodo di almeno circa 3 giorni, almeno circa 5 giorni, almeno circa 7 giorni, almeno circa 10 giorni, almeno circa 14 giorni, almeno circa 21 giorni, almeno circa 25 giorni, almeno circa 28 giorni o almeno circa 31 giorni rispetto a un livello pre-dose.

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 75%, a confronto con un livello sierico pre-dose di colesterolo LDL e la riduzione si prolunga per un periodo di almeno circa 3 giorni, almeno circa 5 giorni, almeno circa 7 giorni, almeno circa 10 giorni, almeno circa 14 giorni, almeno circa 21 giorni, almeno circa 25 giorni, almeno circa 28 giorni o almeno circa 31 giorni rispetto a un livello pre-dose.

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 80%, a confronto con un livello sierico pre-dose di colesterolo LDL e la riduzione si prolunga per un periodo di almeno circa 3 giorni, almeno circa 5 giorni, almeno circa 7 giorni, almeno circa 10 giorni, almeno circa 14 giorni, almeno circa 21 giorni, almeno circa 25 giorni, almeno circa 28 giorni o almeno circa 31 giorni rispetto a un livello pre-dose.

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 85%, a confronto con un livello sierico pre-dose di colesterolo LDL e la riduzione si prolunga per un periodo di almeno circa 3 giorni, almeno circa 5 giorni, almeno circa 7 giorni, almeno circa 10 giorni, almeno circa 14 giorni, almeno circa 21 giorni, almeno circa 25 giorni, almeno circa 28 giorni o almeno circa 31 giorni rispetto a un livello pre-dose.

In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 90%, a confronto con un livello sierico pre-dose di colesterolo LDL e la riduzione si prolunga per un periodo di almeno circa 3 giorni, almeno circa 5 giorni, almeno circa 7 giorni, almeno circa 10 giorni, almeno circa 14 giorni, almeno circa 21 giorni, almeno circa 25 giorni, almeno circa 28 giorni o almeno circa 31 giorni rispetto a un livello pre-dose.

Talune applicazioni terapeutiche

Come sarà apprezzato da un esperto del ramo, disturbi che si correlano a, coinvolgono o possono essere interessati da variati livelli di colesterolo, LDL, LDLR, PCSK9, C-VLDL, apoproteina B ("ApoB"), lipoproteina A ("Lp(a)"), trigliceridi, C-HDL, C-non HDL e



colesterolo totale, possono essere affrontati dalle proteine leganti l'antigene contro PCSK9 descritte nella presente invenzione. In un aspetto, le proteine leganti l'antigene contro PCSK9 possono essere utilizzate in metodi per trattare e/o prevenire e/o ridurre il rischio di disturbi che riguardano livelli sierici elevati di colesterolo o in cui i livelli sierici di colesterolo sono pertinenti. In un aspetto, le proteine leganti l'antigene contro PCSK9 possono essere utilizzate in metodi per trattare e/o prevenire e/o ridurre il rischio di disturbi che riguardano valori elevati di PCSK9 o in cui valori elevati di PCSK9 sono pertinenti. In un aspetto, le proteine leganti l'antigene contro PCSK9 possono essere utilizzate in metodi per trattare e/o prevenire e/o ridurre il rischio di disturbi che riguardano livelli elevati di colesterolo totale o in cui livelli elevati di colesterolo totale sono pertinenti. In un aspetto, le proteine leganti l'antigene contro PCSK9 possono essere utilizzate in metodi per trattare e/o prevenire e/o ridurre il rischio di disturbi che riguardano livelli elevati di colesterolo-non HDL o in cui livelli elevati di colesterolo-non HDL sono pertinenti. In un aspetto, le proteine leganti l'antigene contro PCSK9 possono essere utilizzate in metodi per trattare e/o prevenire e/o ridurre il rischio di disturbi che riguardano livelli elevati di ApoB o in cui livelli elevati di ApoB sono pertinenti. In un aspetto, le proteine leganti l'antigene contro PCSK9 possono essere utilizzate in metodi per trattare e/o prevenire e/o ridurre il rischio di disturbi che riguardano livelli elevati di Lp(a) o in cui livelli elevati di Lp(a) sono pertinenti. In un aspetto, le proteine leganti l'antigene contro PCSK9 possono essere utilizzate in metodi per trattare e/o prevenire e/o ridurre il rischio di disturbi che riguardano livelli elevati di trigliceridi o in cui livelli elevati di trigliceridi sono pertinenti. In un aspetto, le proteine leganti l'antigene contro PCSK9 possono essere utilizzate in metodi per trattare e/o prevenire e/o ridurre il rischio di disturbi che riguardano livelli elevati di C-VLDL o in cui livelli elevati di C-VLDL sono pertinenti.

In un aspetto, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 è utilizzata per modulare i livelli sierici di colesterolo LDL in un paziente. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene contro PCSK9 è utilizzata per ridurre la quantità di colesterolo LDL sierico da un livello abnormemente alto o persino un livello normale. In talune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 30%. In talune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 35%. In talune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 40%. In talune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 45%. In talune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 50%. In talune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL

è ridotto almeno circa del 55%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 60%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 65%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 70%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 75%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa dell'80%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa dell'85%. In alcune forme di realizzazione, il livello sierico di colesterolo LDL è ridotto almeno circa del 90%.

In un aspetto, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 è utilizzata per modulare i valori sierici di PCSK9 in un paziente. In talune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene contro PCSK9 è neutralizzante. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene contro PCSK9 è utilizzata per ridurre i valori di PCSK9 da un livello abnormemente alto o persino un livello normale. In alcune forme di realizzazione, il valore sierico di PCSK9 è ridotto almeno circa del 60%. In alcune forme di realizzazione, il valore sierico di PCSK9 è ridotto almeno circa del 65%. In alcune forme di realizzazione, il valore sierico di PCSK9 è ridotto almeno circa del 70%. In alcune forme di realizzazione, il valore sierico di PCSK9 è ridotto almeno circa del 75%. In alcune forme di realizzazione, il valore sierico di PCSK9 è ridotto almeno circa dell'80%. In alcune forme di realizzazione, il valore sierico di PCSK9 è ridotto almeno circa dell'85%. In alcune forme di realizzazione, il valore sierico di PCSK9 è ridotto almeno circa del 90%.

In un aspetto, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 è utilizzata per modulare il livello di colesterolo totale in un paziente. In talune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene contro PCSK9 è neutralizzante. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene contro PCSK9 è utilizzata per ridurre la quantità di colesterolo totale da un livello abnormemente alto o persino un livello normale. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 20%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 25%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 30%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 35%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 40%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 45%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 50%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto

almeno circa del 55%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo totale è ridotto almeno circa del 60%.

In un aspetto, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 è utilizzata per modulare il livello di colesterolo non HDL in un paziente. In talune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene contro PCSK9 è neutralizzante. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene contro PCSK9 è utilizzata per ridurre il colesterolo non HDL da un livello abnormemente alto o persino un livello normale. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non HDL è ridotto almeno circa del 30%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 35%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 40%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 50%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 55%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 60%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 65%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 70%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa del 75%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa dell'80%. In alcune forme di realizzazione, il livello di colesterolo non-HDL è ridotto almeno circa dell'85%.

In un aspetto, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 è utilizzata per modulare i livelli di ApoB in un paziente. In talune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene contro PCSK9 è neutralizzante. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene contro PCSK9 è utilizzata per ridurre la quantità di ApoB da un livello abnormemente alto o persino un livello normale. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 25%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 30%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 35%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 40%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 45%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 50%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 55%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 60%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 65%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 70%. In alcune forme di realizzazione, il livello di ApoB è ridotto almeno circa del 75%.

In un aspetto, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 è utilizzata per modulare i livelli di Lp(a) in un paziente. In talune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene contro PCSK9 è neutralizzante. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene contro PCSK9 è utilizzata per ridurre la quantità di Lp(a) da un livello abnormemente alto o persino un livello normale. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 5%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 10%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 15%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 20%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 25%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 30%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 35%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 40%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 45%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 50%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 55%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 60%. In alcune forme di realizzazione, il livello di Lp(a) è ridotto almeno circa del 65%.

Come saprà apprezzare un esperto del ramo, le proteine leganti l'antigene contro PCSK9 della presente invenzione possono essere utili dal punto di vista terapeutico nel trattare e/o prevenire disturbi correlati al colesterolo. In alcune forme di realizzazione, "disturbo correlato al colesterolo" (che include "disturbi correlati al colesterolo sierico") include qualsiasi uno o più dei seguenti: ipercolesterolemia familiare, ipercolesterolemia non familiare, iperlipidemia, malattia cardiaca, sindrome metabolica, diabete, malattia coronarica, ictus, malattie cardiovascolari, malattia di Alzheimer e in generale dislipidemie, che possono manifestarsi, ad esempio, tramite colesterolo sierico totale elevato, elevate LDL, trigliceridi elevati, VLDL elevate e/o HDL basse. Alcuni esempi non limitativi di dislipidemie primarie e secondarie che possono essere trattate utilizzando una ABP, da sola o in combinazione con uno o più altri agenti, includono sindrome metabolica, diabete mellito, iperlipidemia familiare combinata, ipertrigliceridemia familiare, ipercolesterolemie familiari, ivi inclusi ipercolesterolemia in eterozigosi, ipercolesterolemia in omozigosi, apolipoproteina B-100 difettiva familiare; ipercolesterolemia poligenica; malattia da rimozione dei remnant, deficit di lipasi epatica; dislipidemia secondaria a qualsiasi dei seguenti: indiscrezione dietetica, ipotiroidismo, farmaci che includono terapia a base di estrogeni e progestinici, beta-bloccanti e diuretici tiazidici; sindrome nefrotica, insufficienza

renale cronica, sindrome di Cushing, cirrosi biliare primitiva, malattie da accumulo di glicogeno, epatopatia, colestasi, acromegalia, insulinoma, deficit isolato dell'ormone della crescita e ipertrigliceridemia indotta da alcol. ABP può anche essere utile nel prevenire o trattare malattie aterosclerotiche, quali, ad esempio, morte cardiovascolare, morte non-cardiovascolare o di qualsiasi causa, malattia coronarica, malattia arteriosa coronarica, malattia arteriosa periferica, ictus (ischemico e emorragico), angina pectoris o malattia cerebrovascolare e sindrome coronarica acuta, infarto del miocardio e angina instabile. In alcune forme di realizzazione, la ABP è utile nel ridurre il rischio di: attacchi cardiaci fatali e non fatali, ictus fatali e non fatali, taluni tipi di interventi di cardiocirurgia, ospedalizzazione per scompenso cardiaco, dolore toracico in pazienti con malattia cardiaca e/o eventi cardiovascolari dovuti a una malattia cardiaca consolidata, quale pregresso attacco cardiaco, pregresso intervento di cardiocirurgia e/o dolore toracico con evidenza di arterie occluse e/o malattia vascolare correlata al trapianto. In alcune forme di realizzazione, la ABP è utile nel prevenire o ridurre il rischio cardiovascolare dovuto a CRP o hsCRP elevata. In alcune forme di realizzazione, la ABP e metodi possono essere utilizzati per ridurre il rischio di eventi cardiovascolari ricorrenti.

Come sarà apprezzato da un esperto del ramo, malattie o disturbi che sono in generale affrontabili (trattabili o prevenibili) con l'uso delle statine possono trarre beneficio anche dall'applicazione delle proteine leganti l'antigene qui in oggetto. In più, in alcune forme di realizzazione, disturbi o malattie che possono trarre beneficio dalla prevenzione della sintesi di colesterolo o da un'espressione aumentata di LDLR possono anche essere trattate dalle varie forme di realizzazione delle proteine leganti l'antigene. In più, come sarà apprezzato da un esperto del ramo, l'uso di anticorpi anti-PCSK9 può essere in special modo utile nel trattamento del diabete. Non soltanto il diabete è un fattore di rischio per la malattia coronarica, ma l'insulina aumenta l'espressione di PCSK9. Vale a dire, persone affette da diabete presentano elevati livelli plasmatici di lipidi (che possono essere correlati ad alti livelli di PCSK9) e possono trarre beneficio da un abbassamento dei loro livelli. Questo in generale discusso in maggior dettaglio in Costet et al. ("Hepatic PCSK9 Expression is Regulated by Nutritional Status via Insulin and Sterol Regulatory Element-binding Protein 1C", J. Biol. Chem., 281: 6211-6218, 2006).

In alcune forme di realizzazione, la proteina legante l'antigene è somministrata a coloro i quali sono affetti da diabete mellito, aneurisma aortico addominale, aterosclerosi e/o malattia vascolare periferica al fine di indurre una diminuzione dei loro livelli sierici di colesterolo sino a un intervallo di sicurezza. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante

l'antigene è somministrata a pazienti a rischio di sviluppo di qualsiasi dei disturbi qui descritti. In alcune forme di realizzazione, le ABP sono somministrate a soggetti fumatori o soggetti che sono stati fumatori in passato (ossia, ex fumatori), affetti da ipertensione o con una familiarità positiva per attacchi cardiaci in giovane età.

In alcune forme di realizzazione, a un soggetto è somministrata una ABP, se egli è a rischio moderato o superiore secondo gli obiettivi di trattamento NCEP 2004. In alcune forme di realizzazione, la ABP è somministrata a un soggetto, se il livello di colesterolo LDL del soggetto è maggiore di 160 mg/dl. In alcune forme di realizzazione, la ABP è somministrata, se il livello di colesterolo LDL del soggetto è maggiore di 130 (e egli è a rischio moderato o moderatamente alto secondo gli obiettivi di trattamento NCEP 2004). In alcune forme di realizzazione, la ABP è somministrata, se il livello di colesterolo LDL del soggetto è maggiore di 100 (e egli è a rischio alto o molto alto secondo gli obiettivi di trattamento NCEP 2004). In alcune forme di realizzazione, la ABP è somministrata, se il livello di colesterolo LDL del soggetto è maggiore di 80 mg/dl. In alcune forme di realizzazione, la ABP è somministrata, se il livello di colesterolo LDL del soggetto è maggiore di 70 mg/dl. Un clinico sarà in grado di selezionare appropriate indicazioni di trattamento e mirare a livelli di lipidi a seconda del profilo individuale del paziente in questione. Uno standard ben accolto per guidare il trattamento di una iperlipidemia è dato dal Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of the High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report, National Institutes of Health, NIH Publication No. 02-5215 (2002).

In alcune forme di realizzazione, le proteine leganti l'antigene contro PCSK9 sono utilizzate per trattare o prevenire ipercolesterolemia, iperlipidemia o dislipidemia e/o nella preparazione di medicinali per le stesse e/o per altri disturbi correlati al colesterolo (quali quelli qui annotati). In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 è utilizzata per trattare o prevenire condizioni, quali ipercolesterolemia, in cui l'attività di PCSK9 è normale. In tali condizioni, ad esempio, una riduzione dell'attività di PCSK9 al di sotto del normale può fornire un effetto terapeutico.

Politerapie

In talune forme di realizzazione, sono forniti metodi per trattare un disturbo correlato al colesterolo, quale ipercolesterolemia, iperlipidemia o dislipidemia, comprendenti la somministrazione di una quantità efficace dal punto di vista terapeutico di una o più proteine leganti l'antigene contro PCSK9 e un altro agente terapeutico. In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 è somministrata prima della

somministrazione di almeno un altro agente terapeutico. In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 in concomitanza con la somministrazione di almeno un altro agente terapeutico. In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 successivamente alla somministrazione di almeno un altro agente terapeutico.

Agenti terapeutici (a parte la proteina legante l'antigene) includono, ma non in via limitativa, almeno un altro agente ipocolesterolemizzante (attivo sul colesterolo sierico e/o totale presente nel corpo). In alcune forme di realizzazione, l'agente induce un aumento dell'espressione di LDLR, si è dimostrato in grado di aumentare i livelli sierici di HDL, abbassare i livelli di LDL o abbassare i livelli di trigliceridi. Agenti esemplificativi includono, ma non in via limitativa, statine (atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina), acido nicotinico (niacina) (NIACOR, NIASPAN (niacina a lento rilascio), SLO-NIACIN (niacina a lento rilascio), CORDAPTIVE (laropirant)), acido fibrico (LOPID (Gemfibrozil), TRICOR (fenofibrato), sequestranti degli acidi biliari (QUESTRAN colestiramina), colesevelam (WELCHOL), COLESTID (colestipolo)), inibitori dell'assorbimento del colesterolo (ZETIA (ezetimibe)), acido nicotinico combinato con statina (ADVICOR (LOVASTATIN e NIASPAN), statina combinata con un inibitore dell'assorbimento (VYTORIN (ZOCOR e ZETIA) e/o agenti modificanti i lipidi. In alcune forme di realizzazione, ABP è combinato con agonisti di PPAR gamma, agonisti di PPAR alfa/gamma, inibitori della squalene sintasi, inibitori di CETP, anti-ipertensivi, agenti anti-diabete (quali solfonil uree, insulina, analoghi di GLP-1, inibitori di DDPIV, ad esempio metformina), modulanti di ApoB, quali mipomersan, inibitori di MTP e/o trattamenti della arteriosclerosi obliterante. In alcune forme di realizzazione, ABP è combinata con un agente che induce un incremento del livello di proteina LDLR in un soggetto, quali statine, talune citochine come la oncostatina M, estrogeno e/o taluni ingredienti vegetali, quali berberina. In alcune forme di realizzazione, ABP è combinata con un agente che induce un incremento dei livelli sierici di colesterolo in un soggetto (quali taluni agenti antipsicotici, taluni inibitori di proteinasi dell'HIV, fattori dietetici, quali elevati fruttosio, saccarosio, colesterolo o taluni acidi grassi e taluni agonisti di recettori nucleari e antagonisti di RXR, RAR, LXR, FXR). In alcune forme di realizzazione, la ABP è combinata con un agente che induce un aumento del livello di PCSK9 in un soggetto, quali statine e/o insulina. La combinazione dei due può far sì che gli effetti collaterali indesiderati degli altri agenti siano mitigati dalla ABP.

In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 può essere

utilizzata con almeno un agente terapeutico che contrasta l'infiammazione. In talune forme di realizzazione, una proteina legante l'antigene contro PCSK9 può essere utilizzata con almeno un agente terapeutico che contrasta un disturbo di natura immunitaria. Agenti terapeutici esemplificativi per disturbi di natura infiammatoria e immunitaria includono, ma non in via limitativa, inibitori di cicloossigenasi di tipo 1 (COX-1) e di cicloossigenasi di tipo 2 (COX-2); modulanti a piccole molecole della protein-chinasi attivata da mitogeno di 38 kDa (p38-MAPK); modulanti a piccole molecole di molecole intracellulari coinvolte nelle vie dell'infiammazione, in cui tali molecole intracellulari includono, ma non in via limitativa, jnk, IKK, NF- κ B, ZAP70 e I κ B. Taluni agenti terapeutici esemplificativi per l'infiammazione sono descritti, ad esempio, in C.A. Dinarello & L.L. Moldawer *Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis: A Primer for Clinicians* Third Edition (2001) Amgen Inc. Thousand Oaks, CA.

Applicazioni diagnostiche

In alcune forme di realizzazione, la ABP è utilizzata quale strumento diagnostico. La ABP può essere utilizzata per saggiare la quantità di PCSK9 presente in un campione e/o soggetto. Come sarà apprezzato da un esperto del ramo, tali ABP non devono essere necessariamente ABP neutralizzanti. In alcune forme di realizzazione, la ABP diagnostica non è una ABP neutralizzante. In alcune forme di realizzazione, la ABP diagnostica si lega a un epitopo differente da quello al quale si lega la ABP neutralizzante. In alcune forme di realizzazione, le due ABP non competono fra loro.

In alcune forme di realizzazione, le ABP qui divulgate sono utilizzate o fornite in un kit di saggio e/o metodo per il rilevamento di PCSK9 in tessuti o cellule di mammifero al fine di porre screening/diagnosi di una malattia o disturbo associata/o a cambiamenti dei livelli di PCSK9. Il kit comprende una ABP che si lega a PCSK9 e sta a indicare il legame della ABP con PCSK9, se presente, e facoltativamente i livelli proteici di PCSK9. Possono essere utilizzati vari mezzi per indicare la presenza di una ABP. Ad esempio, fluorofori, altre sonde molecolari o enzimi possono essere collegati alla ABP e la presenza della ABP può essere osservata in svariati modi. Il metodo di screening per tali disturbi può coinvolgere l'uso del kit o semplicemente l'uso di una delle ABP divulgate e la determinazione che la ABP si legghi o non si legghi a PCSK9 in un campione. Come sarà apprezzato da un esperto del ramo, livelli alti o elevati di PCSK9 risulteranno in quantità maggiori di legame di ABP a PCSK9 nel campione. Così, il grado di legame di ABP può essere utilizzato per determinare quanto PCSK9 vi sia nel campione. Soggetti o campioni con una quantità di PCSK9 maggiore di una quantità prestabilita (ad esempio, una quantità o intervallo che una persona non affetta

da un disturbo correlato a PCSK9 avrebbe) possono essere caratterizzati come aventi un disturbo PCSK9-mediato. In alcune forme di realizzazione, ABP è somministrata a un soggetto che sta assumendo una statina, al fine di determinare, se la statina abbia aumentato la quantità di PCSK9 nel soggetto.

In alcune forme di realizzazione, ABP non è una ABP neutralizzante ed è utilizzata per determinare la quantità di PCSK9 in un soggetto ricevente una ABP e/o trattamento a base di statine.

ESEMPI

Gli Esempi seguenti, che includono gli esperimenti condotti e i risultati ottenuti sono forniti a fini puramente illustrativi e non devono essere intesi limitare la presente invenzione.

ESEMPIO 1

Immunizzazione e titolazione

Generazione di anticorpi anti-PCSK9 e ibridomi

Anticorpi contro la forma matura di PCSK9 (illustrati come sequenza in FIG. 1A, con il prodominio sottolineato) sono stati indotti a prodursi in topi XenoMouse® (Abgenix, Fremont, CA), che sono topi contenenti geni delle immunoglobuline umane. Due gruppi di topi XenoMouse®, il gruppo 1 e il gruppo 2, sono stati utilizzati per produrre anticorpi contro PCSK9. Il gruppo 1 includeva topi del ceppo XMG2-KL di XenoMouse®, che produce anticorpi IgG2 κ e IgG2 λ interamente umani. I topi di gruppo 1 erano immunizzati con PCSK9 umana. PCSK9 è stata preparata, utilizzando tecniche ricombinanti standard, servendosi della sequenza di GenBank quale riferimento (NM_174936). Il gruppo 2 coinvolgeva topi del ceppo XMG4-KL di XenoMouse®, che producono anticorpi IgG4 κ e IgG4 λ interamente umani. I topi di gruppo 2 erano anch'essi immunizzati con PCSK9 umana.

Ai topi di entrambi i gruppi è stato iniettato antigene per undici volte secondo il prospetto riportato in Tabella 3. Nelle immunizzazioni iniziali, a ciascun topo è stato iniettato un totale di 10 μ g di antigene rilasciato per via intraperitoneale nell'addome. Stimolazioni successive sono date da dosi di 5 μ g e il metodo di iniezione è ben ripartito fra iniezioni intraperitoneali nell'addome e iniezioni sottocutanee alla base della coda. Per le iniezioni intraperitoneali, l'antigene è preparato quale emulsione con TiterMax® Gold (Sigma, Cat No. T2684) e per le iniezioni sottocutanee, l'antigene è mescolato con Alum (fosfato di alluminio) e oligo CpG. Nelle iniezioni da 2 a 8 e 10, a ciascun topo è stato iniettato un totale di 5 μ g di antigene nell'adiuvante di gel di alum. Un'iniezione finale di 5 μ g di antigene per topo viene rilasciata in tampone fosfato salino e rilasciata in 2 siti, per il 50% IP nell'addome e per il 50% SQ



alla base della coda. I programmi di immunizzazione sono riassunti in Tabella 3, mostrata qui di seguito.

TABELLA 3

ceppo di topo	XMG2/kl	XMG4/kl
No. di animali	10	10
immunogeno		
1a stimolazione	Iniezione IP di PCSK9-V5/His 10µg ciascuno	Iniezione IP di PCSK9-V5/His 10µg ciascuno
	Titermax Gold	Titermax Gold
2a stimolazione	iniezione nella coda 5µg ciascuna	iniezione nella coda 5µg ciascuna
	Alum/ODN CpG	Alum/ODN CpG
3a stimolazione	Iniezione IP 5 µg ciascuna	Iniezione IP 5 µg ciascuna
	Titermax Gold	Titermax Gold
4a stimolazione	iniezione nella coda 5µg ciascuna	iniezione nella coda 5µg ciascuna
	Alum/ODN CpG	Alum/ODN CpG
5a stimolazione	Iniezione IP 5µg ciascuna	Iniezione IP 5µg ciascuna
	Titermax Gold	Titermax Gold
6a stimolazione	iniezione nella coda 5µg ciascuna	iniezione nella coda 5µg ciascuna
	Alum/ODN CpG	Alum/ODN CpG
7a stimolazione	Iniezione IP 5µg ciascuna	Iniezione IP 5µg ciascuna
	Titermax Gold	Titermax Gold
8a stimolazione	iniezione nella coda 5µg ciascuna	iniezione nella coda 5µg ciascuna
	Alum/ODN CpG	Alum/ODN CpG
prelievo ematico		
9a stimolazione	Iniezione IP 5µg ciascuna	Iniezione IP 5µg ciascuna
	Titermax Gold	Titermax Gold
10a stimolazione	iniezione nella coda 5µg ciascuna	iniezione nella coda 5µg ciascuna
	Alum/ODN CpG	Alum/ODN CpG
11a stimolazione	BIP 5µg ciascuna	BIP 5µg ciascuna
	PBS	PBS
raccolta		

Il protocollo utilizzato per titolare gli animali XenoMouse era come segue: Le piastre a legame del terreno Costar 3368 sono state rivestite con neutravidina @ 8µg/ml (50µl/pozzetto) e lasciate incubare a 4°C in 1X PBS/azide 0,05% per l'intera notte. Esse sono state lavate, utilizzando il lavaggio a 3 cicli TiterTek con acqua RO. Le piastre sono state bloccate, utilizzando 250µl di 1X PBS/latte 1% e lasciate incubare per almeno 30

minuti a RT. Il blocco è stato rimosso con lavaggio, utilizzando il lavaggio a 3 cicli TiterTek con acqua RO. Era poi catturata PCSK9 b-umana @ 2µg/ml in 1XPBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM (diluente di saggio) 50µl/pozzetto e si lasciava poi in incubazione per 1 ora a RT. Si procedeva poi a lavaggio, utilizzando il lavaggio a 3 cicli TiterTek con acqua RO. Per l'anticorpo primario, i sieri sono stati titolati 1:3 in duplicato da 1:100. Questo è stato fatto in diluente di saggio 50µl/pozzetto e si è poi lasciato incubare per 1 ora a RT. Si procedeva poi a lavaggio, utilizzando il lavaggio a 3 cicli TiterTek con acqua RO. L'anticorpo secondario era anti-Fc di IgG umano di capra-HRP @ 400 ng/ml in diluente di saggio 50µl/pozzetto. Questo era lasciato incubare per 1 ora a RT. Era poi lavato, utilizzando il lavaggio a 3 cicli TiterTek con acqua RO e asciugato su fazzoletti di carta. Per il substrato, è stata utilizzata soluzione TMB a una fase (Neogen, Lexington, Kentucky) (50µl/pozzetto) e si è lasciato sviluppare per 30 min a RT.

I protocolli seguiti nei saggi ELISA erano come segue: Per campioni comprendenti b-PCSK9 senza tag V5His, è stato impiegato il seguente protocollo: sono state impiegate piastre a legame del terreno Costar 3368 (Corning Life Sciences). Le piastre sono state rivestite con neutravidina 8 µg/ml in 1XPBS/azide 0,05%, (50 µl/pozzetto). Le piastre erano lasciate incubare a 4°C per l'intera notte. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando un lavatore di piastre Titertek M384 (Titertek, Huntsville, AL). È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Le piastre sono state bloccate con 250 µl di 1XPBS/latte 1% e lasciate incubare per approssimativamente 30 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando il lavatore di piastre M384. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. La cattura era b-hu PCSK9 senza un tag V5 ed è stata aggiunta in concentrazione di 2 µg/ml in 1XPBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM (40 µl/pozzetto). Le piastre sono state poi lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. I sieri sono stati titolati 1:3 in duplicato da 1:100 e H grezzo era il bianco per i sieri. La titolazione è stata fatta in diluente di saggio a un volume di 50 µl/pozzetto. Le piastre sono state lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. A seguire, è stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Anti-Fc di IgG umano di capra-HRP 100 ng/ml (1:4000) in 1XPBS/latte 1%/Ca²⁺ 10nM (50 µl/pozzetto) è stato aggiunto alla piastra e la piastra è stata lasciata incubare 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate una volta ancora, utilizzando un lavaggio a 3 cicli. Le piastre sono state poi asciugate con un fazzolettino di carta. Infine, TMB a 1 fase (Neogen, Lexington, Kentucky) (50 µl/pozzetto) è stata aggiunta alla piastra e la piastra è stata sottoposta a quenching con acido cloridrico 1N (50 µl/pozzetto) dopo 30 minuti a temperatura ambiente. Le OD sono state lette immediatamente a 450 nm, utilizzando un



lettore di piastre Titertek.

Controlli positivi per rilevare PCSK9 legata alla piastra erano il recettore solubile per le LDL (R&D Systems, Cat No.2148LD/CF) e un anticorpo anti-PCSK9 policlonale di coniglio (Caymen Chemical #10007185) titolato 1:3 in duplicato da 3 µg/ml in diluente di saggio. LDLR è stato rilevato con anti-LDLR di capra (R&D Systems, Cat No. AF2148) e anti-Fc di IgG di capra di coniglio-HRP a una concentrazione di 400 ng/ml; il policlonale di coniglio è stato rilevato con anti-Fc di IgG di coniglio di capra a una concentrazione di 400 ng/ml in un diluente di saggio. Il controllo negativo era dato da sieri di XMG2-KL e XMG4-KL nativi, titolati 1:3 in duplicato da 1:100 in diluente di saggio.

Per campioni comprendenti b-PCSK9 con un tag V5His è stato impiegato il seguente protocollo: sono state impiegate piastre a legame del terreno Costar 3368 (Corning Life Sciences). Le piastre sono state rivestite con neutravidina 8 µg/ml in 1XPBS/azide 0,05%, (50 µl/pozzetto). Le piastre erano lasciate incubare a 4°C per l'intera notte. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando un lavatore di piastre Titertek M384 (Titertek, Huntsville, AL). È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Le piastre sono state bloccate con 250 µl di 1XPBS/latte 1% e lasciate incubare per approssimativamente 30 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando il lavatore di piastre M384. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. La cattura era b-hu PCSK9 con un tag V5 ed è stata aggiunta a una concentrazione di 2 µg/ml in 1X PBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM (40 µl/pozzetto). Le piastre sono state poi lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. I sieri sono stati titolati 1:3 in duplicato da 1:100 e H grezzo era il bianco per i sieri. La titolazione è stata fatta in diluente di saggio a un volume di 50 µl/pozzetto. Le piastre sono state lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. A seguire, le piastre sono state lavate, utilizzando il lavatore di piastre M384, mettendolo in funzione per un lavaggio a 3 cicli. Anti-Fc di IgG umano di capra-HRP 400 ng/ml in 1X PBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM è stato aggiunto 50 µl/pozzetto alla piastra e la piastra è stata lasciata incubare per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate una volta ancora, utilizzando un lavaggio a 3 cicli. Le piastre sono state poi asciugate con un fazzolettino di carta. Infine, TMB a 1 fase (Neogen, Lexington, Kentucky) (50 µl/pozzetto) è stata aggiunta alla piastra e la piastra è stata sottoposta a quenching con acido cloridrico 1N (50 µl/pozzetto) dopo 30 minuti a temperatura ambiente. Le OD sono state lette immediatamente a 450 nm, utilizzando un lettore di piastre Titertek.

Il controllo positivo era LDLR, anti-PCSK9 di coniglio titolato 1:3 in duplicato da 3 µg/ml in diluente di saggio. LDLR rilevato con anti-LDLR di capra (R&D Systems, Cat No.



AF2148) e anti-Fc di IgG di capra di coniglio-HRP a una concentrazione di 400 ng/ml; poli di coniglio rilevato con anti-Fc di IgG di coniglio di capra a una concentrazione di 400 ng/ml in diluente di saggio. Anti-His 1.2,3 e anti-V5 1.7.1 umani, titolati 1:3 in duplicato da 1 µg/ml in diluente di saggio; entrambi rilevati con anti-Fc di IgG umano di capra-HRP a una concentrazione di 400 ng/ml in diluente di saggio. Il controllo negativo era dato da sieri di XMG2-KL e XMG4-KL nativi, titolati 1:3 in duplicato da 1:100 in diluente di saggio.

I titoli dell'anticorpo contro PCSK9 umana sono stati esaminati mediante saggio ELISA per topi immunizzati con antigene solubile, come descritto. Tabella 4 riassume i dati di ELISA e indica che vi erano alcuni topi apparentemente specifici per PCSK9. *Si veda, ad esempio,* la Tabella 4. Pertanto, al termine del programma di immunizzazione, 10 topi (in grassetto in Tabella 4) sono stati selezionati per la raccolta e splenociti e linfociti sono stati isolati da milza e linfonodi, rispettivamente, come qui descritto.

TABELLA 4

Riassunto dei risultati ELISA

	ID dell'animale	Titolo	Titolo
		PCSK9 (V5His) @ 2 µg/ml	PCSK9 b-hu @ 2 µg/ml
Gruppo 1 - IgG2k/l	P175807	> 72900 @ OD 2,2	68359
	P175808	> 72900 @ OD 2,3	> 72900 @ OD 2,5
	P175818	>72900 @ OD 3,2	>72900 @ OD 3,0
	P175819	>72900 @ OD 3,4	>72900 @ OD 3,2
	P175820	> 72900 @ OD 2,4	> 72900 @ OD 2,5
	P175821	> 72900 @ OD 3,4	> 72900 @ OD 3,0
	P175830	> 72900 @ OD 2,6	> 72900 @ OD 2,5
	P175831	> 72900 @ OD 3,1	> 72900 @ OD 3,1
	P175832	> 72900 @ OD 3,8	> 72900 @ OD 3,6
	P175833	> 72900 @ OD 2,6	> 72900 @ OD 2,3
Gruppo 2 – IgG4 k/l	P174501	19369	17109
	P174503	31616	23548
	P174508	48472	30996
	P174509	23380	21628
	P174510	15120	9673
	P175773	19407	15973
	P175774	54580	44424
	P175775	60713	55667
	P175776	30871	22899
	P175777	16068	12532
	G2 naive	< 100 @ OD 0,54	< 100 @ OD 0,48
	G4 naive	< 100 @ OD 1,57	< 100 @ OD 1,32

ESEMPIO 2

Recupero di linfociti, isolamenti di cellule B, fusioni e generazione di ibridomi

Questo Esempio evidenzia come le cellule immunitarie siano state recuperate e gli ibridomi siano stati generati. Topi immunizzati selezionati sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale e i linfonodi drenanti sono stati raccolti e raggruppati insieme da ciascuna coorte. Le cellule B erano dissociate dal tessuto linfoide tramite macinazione in DMEM per far sì che le cellule si rilascino dai tessuti e le cellule sono state sospese in DMEM. Le cellule sono state contate e 0,9 ml di DMEM per 100 milioni di linfociti sono stati aggiunti al sedimento cellulare per sospendere le cellule delicatamente e completamente.

I linfociti erano miscelati con cellule P3X63Ag8.653 di mieloma non secretivo, acquistate presso ATCC, cat. No. CRL 1580 (Kearney *et al.*, (1979) *J. Immunol.* 123, 1548-1550) in un rapporto di 1:4. La miscela cellulare è stata delicatamente fatta sedimentare mediante centrifugazione a 400 x g 4 min. Dopo decantazione del surnatante, le cellule sono state delicatamente miscelate, utilizzando una pipetta da 1 ml. Una soluzione pre-riscaldata di PEG/DMSO di Sigma (cat. No. P7306) (1 ml per milione di cellule B) è stata lentamente aggiunta con delicata agitazione per 1 min, a cui ha fatto seguito 1 min di miscelazione. IDMEM pre-riscaldato (2 ml per milione di cellule B) (DMEM privo di glutammina, L-glutammina, pen/strep, amminoacidi non essenziali per MEM (tutti di Invitrogen), è stato poi aggiunto per 2 minuti sotto delicata agitazione. Infine, IDMEM pre-riscaldato (8 ml per 10⁶ di cellule B) è stato aggiunto per 3 minuti.

Le cellule fuse sono state centrifugate a 400 x g 6 min e risospese in 20 ml di terreni di selezione (DMEM (Invitrogen), FBS 15% (Hyclone), integrati con L-glutammina, pen/strep, amminoacidi non essenziali per MEM, piruvato di sodio, 2-mercaptoetanolo (tutti di Invitrogen), HA-ipoxantina-azaserina e OPI (ossaloacetato, piruvato, insulina di bovino) (entrambi di Sigma) e IL-6 (Boehringer Mannheim)) per milione di cellule B. Le cellule sono state incubate per 20-30 min a 37°C e poi risospese in 200 ml di terreni di selezione e sottoposte a coltura per 3-4 giorni in beuta T175 prima di piastrarle su piastra da 96 pozzetti. Così, sono stati prodotti ibridomi che producevano proteine leganti l'antigene contro PCSK9.

ESEMPIO 3

Selezione di anticorpi contro PCSK9

Il presente Esempio evidenzia come le varie proteine leganti l'antigene contro PCSK9 siano state caratterizzate e selezionate. È stato valutato il legame di anticorpi secreti (prodotti dagli ibridomi prodotti negli Esempi 1 e 2) a PCSK9. La selezione di anticorpi si basava su dati



di legame e sull'inibizione del legame di PCSK9 al LDLR e sull'affinità. Il legame a PCSK9 solubile era analizzato mediante ELISA, come qui più avanti descritto. BIAcore® (risonanza plasmonica di superficie) è stato utilizzato per quantificare l'affinità di legame.

Screening primario

È stato effettuato uno screening primario per anticorpi che si legano a PCSK9 di tipo selvatico. Lo screening primario era effettuato su due raccolte. Lo screening primario comprendeva un saggio ELISA ed era effettuato, utilizzando il seguente protocollo:

Sono state impiegate piastre a legame del terreno da 384 pozzetti Costar 3702 (Corning Life Sciences). Le piastre sono state rivestite con neutravidina a una concentrazione di 4 µg/ml in 1XPBS/azide 0,05% a un volume di 40 µl/pozzetto. Le piastre erano lasciate incubare a 4°C per l'intera notte. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando un lavatore di piastre Titertek (Titertek, Huntsville, AL). È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Le piastre sono state bloccate con 90 µl di 1XPBS/latte 1% e lasciate incubare approssimativamente per 30 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate. Di nuovo, è stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Il campione di cattura era PCSK9 biotinilata senza tag V5 ed è stato aggiunto a una concentrazione di 0,9 µg/ml in 1XPBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM a un volume di 40 µg/pozzetto. Le piastre sono state poi lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. A seguire, le piastre sono state lavate, utilizzando il lavatore di piastre Titertek, mettendolo in funzione per un lavaggio a 3 cicli. 10 µl di surnatante sono stati trasferiti in 40 µl di 1XPBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM e si è proceduto a incubare per 1,5 ore a temperatura ambiente. Di nuovo, le piastre sono state lavate, utilizzando il lavatore di piastre Titertek, mettendolo in funzione per un lavaggio a 3 cicli. 40 µl/pozzetto di anti-Fc di IgG umano di capra-POD a una concentrazione di 100 ng/ml (1:4000) in 1XPBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM sono stati aggiunti alla piastra e la piastra è stata lasciata incubare per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate una volta ancora, utilizzando un lavaggio a 3 cicli. Infine, 40 µl/pozzetto di TMB a una fase (Neogen, Lexington, Kentucky) sono stati aggiunti alla piastra e quenching con 40 µl/pozzetto di acido cloridrico 1N è stato effettuato dopo 30 minuti a temperatura ambiente. Le OD sono state lette immediatamente a 450 nm, utilizzando un lettore di piastre Titertek.

Lo screening primario risultava in un totale di 3104 ibridomi antigene-specifici che erano identificati dai due raccolti. Sulla base della OD ELISA più alta, 1500 ibridomi per raccolto sono stati fatti avanzare per un totale di 3000 positivi.

Screening di conferma

I 3000 positivi erano poi nuovamente sottoposti a screening per il legame alla PCSK9 di tipo



selvatico per confermare che si fossero consolidati ibridomi stabili. Lo screening è stato effettuato come segue: Sono state impiegate piastre a legame del terreno da 384 pozzetti Costar 3702 (Corning Life Sciences). Le piastre sono state rivestite con neutravidina 3 µg/ml in 1XPBS/azide 0,05% a un volume di 40 µl/pozzetto. Le piastre erano lasciate incubare a 4°C per l'intera notte. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando un lavatore di piastre Titertek (Titertek, Huntsville, AL). È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Le piastre sono state bloccate con 90 µl di 1XPBS/latte 1% e lasciate incubare approssimativamente per 30 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando il lavatore di piastre M384. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Il campione di cattura era b-PCSK9, senza tag V5 ed era aggiunto a una concentrazione di 0,9 µg/ml in 1XPBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM a un volume di 40 µl/pozzetto. Le piastre sono state poi lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. A seguire, le piastre sono state lavate, utilizzando un lavaggio a 3 cicli. 10 µl di surnatante sono stati trasferiti in 40 µl di 1XPBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM e si è proceduto a incubare per 1,5 ore a temperatura ambiente. Di nuovo, le piastre sono state lavate, utilizzando il lavatore di piastre Titertek, mettendolo in funzione per un lavaggio a 3 cicli. 40 µl/pozzetto di anti-Fc di IgG umano di capra-POD a una concentrazione di 100 ng/ml (1:4000) in 1XPBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM sono stati aggiunti alla piastra e la piastra è stata lasciata incubare per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate una volta ancora, utilizzando il lavatore di piastre Titertek, mettendolo in funzione per un lavaggio a 3 cicli. Infine, 40 µl/pozzetto di TMB a una fase (Neogen, Lexington, Kentucky) sono stati aggiunti alla piastra e la piastra è stata sottoposta a quenching con 40 µl/pozzetto di acido cloridrico 1N dopo 30 minuti a temperatura ambiente. Le OD sono state lette immediatamente a 450 nm, utilizzando un lettore di piastre Titertek. Un totale di 2441 positivi era ripetuto nel secondo screening. Questi anticorpi sono stati, poi, utilizzati negli screening successivi.

Screening di reattività crociata nel topo

Il pannello di ibridomi è stato poi sottoposto a screening per reattività crociata a PCSK9 di topo per accertarsi che gli anticorpi potessero legarsi a PCSK9 sia umana che di topo. Il seguente protocollo è stato impiegato nello screening della reattività crociata: Sono state impiegate piastre a legame del terreno da 384 pozzetti Costar 3702 (Corning Life Sciences). Le piastre sono state rivestite con neutravidina 3 µg/ml in 1XPBS/azide 0,05% a un volume di 40 µl/pozzetto. Le piastre erano lasciate incubare a 4°C per l'intera notte. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando un lavatore di piastre Titertek (Titertek, Huntsville, AL). È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Le piastre sono state bloccate con 90 µl di 1XPBS/latte 1%



e lasciate incubare approssimativamente per 30 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando il lavatore di piastre Titertek. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Il campione di cattura era PCSK9 di topo biotinilata ed era aggiunto a una concentrazione di 1 µg/ml in 1XPBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM a un volume di 40 µl/pozzetto. Le piastre sono state poi lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. A seguire, le piastre sono state lavate, utilizzando il lavatore di piastre Titertek, mettendolo in funzione per un lavaggio a 3 cicli. 50 µl di surnatante sono stati trasferiti alle piastre che sono state poi lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. Di nuovo, le piastre sono state lavate, utilizzando un lavaggio a 3 cicli. 40 µl/pozzetto di anti-Fc di IgG umano di capra-POD a una concentrazione di 100 ng/ml (1:4000) in 1XPBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM sono stati aggiunti alla piastra e la piastra è stata lasciata incubare per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate una volta ancora, utilizzando un lavaggio a 3 cicli. Infine, 40 µl/pozzetto di TMB a una fase (Neogen, Lexington, Kentucky) sono stati aggiunti alla piastra e si è proceduto a quenching con 40 µl/pozzetto di acido cloridrico 1N dopo 30 minuti a temperatura ambiente. Le OD sono state lette immediatamente a 450 nm, utilizzando un lettore di piastre Titertek. Si è osservato che 579 anticorpi reagivano in maniera crociata con PCSK9 di topo. Questi anticorpi sono stati, poi, utilizzati negli screening successivi.

Screening di legame al mutante D374Y

La mutazione D374Y in PCSK9 è stata documentata nella popolazione umana (ad esempio, Timms KM et al, "A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree", Hum. Genet. 114: 349-353, 2004). Al fine di determinare se gli anticorpi fossero specifici per il di tipo selvatico o si legassero anche alla forma D374Y di PCSK9, i campioni sono stati poi sottoposti a screening per il legame alla sequenza di PCSK9 mutante comprendente la mutazione D374Y. Il protocollo dello screening era come segue: Nello screening sono state impiegate piastre a legame del terreno da 384 pozzetti Costar 3702 (Corning Life Sciences). Le piastre sono state rivestite con neutravidina 4 µg/ml in 1XPBS/azide 0,05% a un volume di 40 µl/pozzetto. Le piastre erano lasciate incubare a 4°C per l'intera notte. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando un lavatore di piastre Titertek (Titertek, Huntsville, AL). È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Le piastre sono state bloccate con 90 µl di 1XPBS/latte 1% e lasciate incubare approssimativamente per 30 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando il lavatore di piastre Titertek. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Le piastre sono state rivestite con PCSK9 biotinilata umana D374Y a una concentrazione di 1 µg/ml in 1XPBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM e lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate,



utilizzando il lavatore di piastre Titertek. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Surnatante di coltura di ibridoma esausto tardivo è stato diluito 1:5 in PBS/latte/ Ca^{2+} (10 ml più 40 ml) e lasciato incubare per 1 ora a temperatura ambiente. A seguire, 40 μl /pozzetto di anti-PCSK9 umana di coniglio (Cayman Chemical) e anti-His 1.2.3 1:2 umana 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 1XPBS/latte 1%/M Ca^{2+} 10 mM sono stati titolati sulle piastre che sono state poi lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando il lavatore di piastre Titertek. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. 40 μl /pozzetto di anti-Fc di IgG umano di capra-HRP a una concentrazione di 100 ng/ml (1:4000) in 1X PBS/latte 1%/M Ca^{2+} 10 mM sono stati aggiunti alla piastra e la piastra è stata lasciata incubare per 1 ora a temperatura ambiente. 40 μl /pozzetto di anti-Fc di IgG di coniglio di capra-HRP a una concentrazione di 100 ng/ml (1:4000) in 1XPBS/latte 1%/M Ca^{2+} 10 mM sono stati aggiunti alla piastra e la piastra è stata lasciata incubare per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando il lavatore di piastre Titertek. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Infine, 40 μl /pozzetto di TMB a una fase (Neogen, Lexington, Kentucky) sono stati aggiunti alla piastra e la piastra è stata sottoposta a quenching con 40 μl /pozzetto di acido cloridrico 1N dopo 30 minuti a temperatura ambiente. Le OD sono state lette immediatamente a 450 nm, utilizzando un lettore di piastre Titertek. Più del 96% delle occorrenze positive sulla PCSK9 di tipo selvatico legava anche la PCSK9 mutante.

Screening di blocco del ligando al recettore su larga scala

Per sottoporre a screening gli anticorpi che bloccano il legame di PCSK9 a LDLR, è stato sviluppato un saggio che utilizza il mutante di PCSK9 D374Y. Il mutante è stato utilizzato per questo saggio poiché esso presenta una maggiore affinità di legame a LDLR, consentendo di sviluppare un saggio più sensibile di blocco del ligando al recettore. Nello screening di blocco del ligando al recettore è stato impiegato il seguente protocollo: Nello screening sono state impiegate piastre a legame del terreno da 384 pozzetti Costar 3702 (Corning Life Sciences). Le piastre sono state rivestite con anti-LDLR di capra (R&D Cat No. AF2148) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 1XPBS/azide 0,05% a un volume di 40 μl /pozzetto. Le piastre erano lasciate incubare a 4°C per l'intera notte. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando un lavatore di piastre Titertek (Titertek, Huntsville, AL). È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Le piastre sono state bloccate con 90 μl di 1X PBS/latte 1% e lasciate incubare per approssimativamente 30 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando il lavatore di piastre Titertek. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Il campione di cattura era LDLR (R&D, Cat No. 2148LD/CF) ed è stato aggiunto in concentrazione di 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 1XPBS/latte 1%/M Ca^{2+} 10 mM a un volume di 40 μl /pozzetto. Le piastre sono

state poi incubate per 1 ora e 10 minuti a temperatura ambiente. Contemporaneamente, 20 ng/ml di PCSK9 biotinilata umana D374Y sono stati lasciati incubare con 15 microlitri di surnatante esausto di ibridoma in piastre di polipropilene Nunc e la concentrazione di surnatante esausto è stata diluita 1:5. Le piastre sono state poi lasciate pre-incubare per circa 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente. A seguire, le piastre sono state lavate, utilizzando il lavatore di piastre Titertek, mettendolo in funzione per un lavaggio a 3 cicli. 50 µl/pozzetto della miscela pre-incubata sono stati trasferiti sulle piastre ELISA rivestite da LDLR e le piastre sono state lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. Per rilevare b-PCSK9 legata a LDLR, 40 µl/pozzetto di streptavidina-HRP 500 ng/ml in diluente di saggio sono stati aggiunti alle piastre. Le piastre sono state lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state di nuovo lavate, utilizzando un lavatore di piastre Titertek. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Infine, 40 µl/pozzetto di TMB a una fase (Neogen, Lexington, Kentucky) sono stati aggiunti alla piastra e la piastra è stata sottoposta a quenching con 40 µl/pozzetto di acido cloridrico 1N dopo 30 minuti a temperatura ambiente. Le OD sono state lette immediatamente a 450 nm, utilizzando un lettore di piastre Titertek. Lo screening identificava 384 anticorpi che bloccavano bene l'interazione fra PCSK9 e il pozzetto, 100 anticorpi bloccavano l'interazione fortemente ($OD < 0,3$). Questi anticorpi inibivano l'interazione di legame di PCSK9 e LDLR per più del 90% (maggiore di una inibizione del 90%).

Saggio di legame del ligando al recettore su un sottogruppo di bloccanti

Il saggio del ligando al recettore è stato poi ripetuto, utilizzando l'enzima mutante sul sottogruppo di 384 membri di neutralizzanti identificati nel primo saggio di inibizione del ligando al recettore su larga scala. Lo stesso protocollo è stato impiegato nello screening del saggio del sottogruppo di bloccanti di 384 membri come attuato nello screening di blocco del ligando al recettore su larga scala. Questo screening ripetuto confermava i dati di screening iniziali.

Questo screening del sottogruppo di 384 membri identificava 85 anticorpi che bloccavano l'interazione fra l'enzima mutante PCSK9 e il LDLR per più del 90%.

Saggio di legame del ligando al recettore di bloccanti che si legano alla PCSK9 di tipo selvatico, ma non al mutante D374Y

Nel pannello iniziale di 3000 sorsi vi erano 86 anticorpi che si erano mostrati in grado di legarsi specificamente alla PCSK9 di tipo selvatico e non al mutante huPCSK9(D374Y). Questi 86 sorsi erano esaminati per la loro capacità di bloccare il legame di PCSK9 di tipo selvatico al recettore LDLR. È stato impiegato il seguente protocollo: Nello screening sono

state impiegate piastre a legame del terreno da 384 pozzetti Costar 3702 (Corning Life Sciences). Le piastre sono state rivestite con anti-His 1.2.3 10 µg/ml in 1XPBS/azide 0,05% a un volume di 40 µl/pozzetto. Le piastre erano lasciate incubare a 4°C per l'intera notte. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando un lavatore di piastre Titertek (Titertek, Huntsville, AL). È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Le piastre sono state bloccate con 90 µl di 1XPBS/latte 1% e lasciate incubare approssimativamente per 30 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando il lavatore di piastre Titertek. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. LDLR (R&D Systems, No. 2148LD/CF o R&D Systems, No. 2148LD) è stato aggiunto in concentrazione di 5 µg/ml in 1XPBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM a un volume di 40 µl/pozzetto. Le piastre sono state poi lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. A seguire, le piastre sono state lavate, utilizzando il lavatore di piastre Titertek, mettendolo in funzione per un lavaggio a 3 cicli. Contemporaneamente, PCSK9 umana di tipo selvatico biotinilata è stata pre-incubata con surnatante esausto di ibridoma in piastre di polipropilene Nunc. 22 µl di sorso di ibridoma sono stati trasferiti in 33µl di b-PCSK9 in concentrazione di 583 ng/ml in 1XPBS/latte 1%/Ca²⁺ 10 mM, fornendo una concentrazione finale di b-PCSK9 = 350 ng/ml e il surnatante esausto a una diluizione finale di 1:2,5. Le piastre sono state preincubate per approssimativamente 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente. 50 µl/pozzetto della miscela pre-incubata sono stati trasferiti su piastre ELISA con cattura di LDLR e incubate per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando il lavatore di piastre Titertek. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. 40 µl/pozzetto di streptavidina-HRP 500 ng/ml in diluente di saggio sono stati aggiunti alle piastre. Le piastre sono state lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. Le piastre sono state poi lavate, utilizzando il lavatore di piastre Titertek. È stato effettuato un lavaggio a 3 cicli. Infine, 40 µl/pozzetto di TMB a una fase (Neogen, Lexington, Kentucky) sono stati aggiunti alla piastra e la piastra è stata sottoposta a quenching con 40 µl/pozzetto di acido cloridrico 1N dopo 30 minuti a temperatura ambiente. Le OD sono state lette immediatamente a 450 nm, utilizzando un lettore di piastre Titertek.

Risultati dello screening

Sulla base dei risultati dei saggi descritti, sono state identificate numerose linee di ibridoma come produttori anticorpi con interazioni desiderate con PCSK9. Diluizione limite è stata utilizzata per isolare un numero maneggevole di cloni da ciascuna linea. I cloni sono stati designati da un numero di linea di ibridoma (ad esempio, 21B12) e un numero di clone (ad esempio, 21B12.1). In generale, mediante i saggi funzionali qui descritti non si rilevava



alcuna differenza fra i differenti cloni di una linea particolare. In pochi casi, i cloni erano identificati da una linea particolare che si comportava diversamente nei saggi funzionali, ad esempio si trovava che 25A7.1 non bloccasse PCSK9/LDLR, ma 25A7.3 (a cui ci si riferisce qui come a 25A7) era neutralizzante. I cloni isolati erano ciascuno espanso in 50-100 ml di terreno per ibridoma e lasciati crescere sino ad esaurimento (ossia, vitalità cellulare inferiore circa al 10%). La concentrazione e la potenza degli anticorpi contro PCSK9 nei surnatanti di quelle colture sono state determinate mediante ELISA e tramite un esame funzionale *in vitro*, come qui descritto. Dallo screening qui descritto risulta che sono stati identificati gli ibridomi con il titolo più alto di anticorpi contro PCSK9. Gli ibridomi selezionati sono mostrati nelle FIGG. 2A-3D e in Tabella 2.

ESEMPIO 4.1

Produzione di anticorpi IgG4 31H4 umani da ibridomi.

Questo Esempio descrive in generale come una delle proteine leganti l'antigene sia prodotta da una linea di ibridoma. Il lavoro di produzione utilizzava la generazione di 50 ml di surnatante esausto, seguita da purificazione con proteina A. La produzione Integra era per un impiego su larga scala che è stato effettuato in seguito. La linea di ibridoma 31H4 è stata fatta crescere in beute T75 in 20 ml di terreno (terreno Integra, Tabella 5). Quando l'ibridoma era prossimo alla confluenza nelle beute T75, è stato trasferito in una beuta Integra (Integra Biosciences, Integra CL1000, cat. No. 90 005).

La beuta Integra è una beuta per coltura cellulare suddivisa da una membrana in due camere, una camera piccola e una camera grande. Un volume di 20-30 ml di cellule di ibridoma con una densità cellulare minima di 1×10^6 cellule per ml della linea di ibridoma 31H4 è stato posto nella piccola camera di una beuta Integra in terreno Integra (si veda Tabella 5 per le componenti del terreno Integra). Terreno Integra da solo (1L) è stato posto nelle camere grandi delle beute Integra. La membrana che separa le due camere è permeabile a nutrienti di piccolo peso molecolare, ma è impermeabile a cellule di ibridoma e ad anticorpi prodotti da quelle cellule. Così, le cellule di ibridoma e gli anticorpi prodotti da quelle cellule di ibridoma sono stati trattenuti nella camera piccola.

Dopo una settimana, il terreno è stato rimosso da entrambe le camere della beuta Integra ed è stato sostituito da terreno Integra fresco. Il terreno raccolto dalle camere piccole è stato trattenuto separatamente. Dopo una seconda settimana di crescita, il terreno della camera piccola è stato di nuovo raccolto. Il terreno raccolto dalla settimana 1 dalla linea di ibridoma è stato combinato con il terreno raccolto dalla settimana 2 dalla linea di ibridoma. Il risultante campione di terreno raccolto dalla linea di ibridoma è stato centrifugato per rimuovere

cellule e detriti (15 minuti a 3000 rpm) e il surnatante risultante è stato filtrato (0,22µm).

Il terreno condizionato chiarificato è stato caricato su una colonna di sefarosio contenente proteina A. Facoltativamente, il terreno può essere dapprima concentrato e successivamente caricato su una colonna di sefarosio contenente la proteina A. Legami aspecifici sono stati rimossi mediante un abbondante lavaggio con PBS. Proteine anticorpali legate, presenti sulla colonna contenente la proteina A, sono state recuperate tramite eluizione acida standard con anticorpi dalle colonne contenenti la proteina A (quali citrato 50 mM, pH 3,0). Proteine anticorpali aggregate nel pool di sefarosio con proteina A sono state rimosse mediante cromatografia ad esclusione dimensionale o combinando la cromatografia a scambio ionico a una resina a scambio anionico, quale resina di sefarosio Q. Le specifiche condizioni IEX per le proteine 31H4 sono HP con sefarosio Q a pH 7,8-8,0. L'anticorpo è stato diluito con un gradiente di NaCl 10 mM-500 mM in 25 volumi di colonna.

TABELLA 5
Composizione del terreno

TERRENO INTEGRA
HSFM
Siero a contenuto ultra basso di IgG 10%
L-glutammina 2 mmol/L
NEAA 1%
Glucosio 4 g/l

ESEMPIO 4.2

Produzione di anticorpi IgG2 umani 31H4 ricombinanti

Da cellule trasfettate

Il presente Esempio evidenzia come anticorpi IgG2 31H4 siano prodotti da cellule trasfettate. Cellule 293 per un'espressione transitoria e cellule CHO per un'espressione stabile sono state trasfettate con plasmidi che codificano per le catene pesanti e leggere di 31H4. Terreni condizionati da cellule trasfettate sono stati recuperati, rimuovendo le cellule e i detriti cellulari. Il terreno condizionato chiarificato è stato caricato su una colonna di sefarosio contenente proteina A. Facoltativamente, il terreno può essere dapprima concentrato e poi caricato su una colonna di sefarosio contenente proteina A. Legami aspecifici sono stati rimossi mediante abbondante lavaggio con PBS. Proteine anticorpali legate, presenti sulla colonna contenente la proteina A, sono state recuperate tramite eluizione acida standard con anticorpi dalle colonne contenenti la proteina A (quali citrato 50 mM, pH 3,0). Proteine



anticorpali aggregate nel pool di sefarosio con proteina A sono state rimosse mediante cromatografia ad esclusione dimensionale o combinando la cromatografia a scambio ionico a una resina a scambio anionico, quale resina di sefarosio Q. Le specifiche condizioni IEX per le proteine 31H4 sono HP con sefarosio Q a pH 7,8-8,0. L'anticorpo è stato eluito con un gradiente di NaCl 10 mM -500 mM in 25 volumi di colonna.

ESEMPIO 5

Produzione di anticorpi IgG4 21B12 umani da ibridomi

Il presente Esempio evidenzia come l'anticorpo IgG4 21B12 sia stato prodotto da ibridomi. La linea di ibridoma 21B12 è stata fatta crescere in beute T75 in un terreno (terreno Integra, Tabella 5). Quando l'ibridoma era prossimo alla confluenza nelle beute T75, è stato trasferito in una beuta Integra (Integra Biosciences, Integra CL1000, cat. No. 90 005).

La beuta Integra è una beuta per coltura cellulare suddivisa da una membrana in due camere, una camera piccola e una camera grande. Un volume di 20-30 ml di cellule di ibridoma con una densità cellulare minima di 1×10^6 cellule per ml della linea di ibridoma 31H4 è stato posto nella piccola camera di una beuta Integra in terreno Integra (si veda Tabella 5 per le componenti del terreno Integra). Terreno Integra da solo (1L) è stato posto nelle camere grandi delle beute Integra. La membrana che separa le due camere è permeabile a nutrienti di piccolo peso molecolare, ma è impermeabile a cellule di ibridoma e ad anticorpi prodotti da quelle cellule. Così, le cellule di ibridoma e gli anticorpi prodotti da quelle cellule di ibridoma sono stati trattenuti nella camera piccola.

Dopo una settimana, il terreno è stato rimosso da entrambe le camere della beuta Integra ed è stato sostituito da terreno Integra fresco. Il terreno raccolto dalle camere piccole è stato trattenuto separatamente. Dopo una seconda settimana di crescita, il terreno della camera piccola è stato di nuovo raccolto. Il terreno raccolto dalla settimana 1 dalla linea di ibridoma è stato combinato con il terreno raccolto dalla settimana 2 dalla linea di ibridoma. Il risultante campione di terreno raccolto dalla linea di ibridoma è stato centrifugato per rimuovere cellule e detriti (15 minuti a 3000 rpm) e il surnatante risultante è stato filtrato (3000,22 μ m). Il terreno condizionato chiarificato è stato caricato su una colonna di sefarosio contenente proteina A. Facoltativamente, il terreno può essere dapprima concentrato e successivamente caricato su una colonna di sefarosio contenente la proteina A. Legami aspecifici sono stati rimossi mediante un abbondante lavaggio con PBS. Proteine anticorpali legate, presenti sulla colonna contenente la proteina A, sono state recuperate tramite eluizione acida standard con anticorpi dalle colonne contenenti la proteina A (quali citrato 50 mM, pH 3,0). Proteine anticorpali aggregate nel pool di sefarosio con proteina A sono state rimosse mediante

cromatografia ad esclusione dimensionale o combinando la cromatografia a scambio ionico a una resina a scambio anionico, quale resina di sefarosio Q. Le specifiche condizioni IEX per le proteine 21B12 sono HP con sefarosio Q a pH 7,8-8,0. L'anticorpo è stato eluito con un gradiente di NaCl 10 mM -500 mM in 25 volumi di colonna.

ESEMPIO 6

Produzione di anticorpi IgG2 21B12 umani

Da cellule trasfettate

Il presente Esempio evidenzia come anticorpi IgG2 21B12 fossero prodotti da cellule trasfettate. Le cellule (cellule 293 per un'espressione transitoria e cellule CHO per un'espressione stabile) sono state trasfettate con plasmidi che codificano per le catene pesanti e leggere di 21B12. I terreni condizionati da cellule di ibridoma sono stati recuperati, rimuovendo cellule e detriti cellulari. Terreni condizionati chiarificati sono stati caricati su una colonna di sefarosio contenente proteina A. Facoltativamente, il terreno può essere dapprima concentrato e poi caricato su una colonna di sefarosio contenente proteina A. Legami aspecifici sono stati rimossi mediante abbondante lavaggio con PBS. Proteine anticorpali legate, presenti sulla colonna contenente la proteina A, sono state recuperate tramite eluizione acida standard con anticorpi dalle colonne contenenti la proteina A (citrato 50 mM, pH 3,0). Proteine anticorpali aggregate nel pool di sefarosio con proteina A sono state rimosse mediante cromatografia ad esclusione dimensionale o combinando la cromatografia a scambio ionico a una resina a scambio anionico, quale resina di sefarosio SP. Le specifiche condizioni IEX per le proteine 21B12 sono HP con sefarosio Q a pH 5,2. Anticorpi sono stati eluiti con 25 volumi di colonna di tampone che contiene un gradiente di NaCl 10 mM - 500 mM in tampone acetato di sodio 20 mM.

ESEMPIO 7

Analisi di sequenza di catene anticorpali leggere e pesanti

Le sequenze di acido nucleico e amminoacidiche per le catene leggere e pesanti degli anticorpi sopra discussi sono state poi determinate mediante sequenziamento nucleotidico di Sanger (dideoossi). Dalle sequenze amminoacidiche sono state poi dedotte le sequenze di acido nucleico. Le sequenze di acido nucleico per i domini variabili sono illustrate nelle FIGG. 3E-3JJ.

Le sequenze di cDNA per le regioni variabili di catena leggera lambda di 31H4, 21B12 e 16F12 sono state determinate e sono divulgate come SEQ ID NO: 153, 95 e 105, rispettivamente.

Le sequenze di cDNA per le regioni variabili di catena pesante di 31H4, 21B12 e 16F12



sono state determinate e sono divulgate come SEQ ID NO: 152, 94 e 104, rispettivamente. La regione costante di catena leggera lambda (SEQ ID NO: 156) e le regioni costanti di catena pesante di IgG2 e IgG4 (SEQ ID NO: 154 e 155) sono mostrate in FIG. 3KK. Sono state determinate le sequenze polipeptidiche previste da ciascuna di quelle sequenze di cDNA. Le sequenze polipeptidiche previste per le regioni variabili di catena leggera lambda di 31H4, 21B12 e 16F12 sono state previste e sono divulgate come SEQ ID NO: 12, 23, e 35 rispettivamente, la regione costante di catena leggera lambda (SEQ ID NO: 156), le regioni variabili di catena pesante di 31H4, 21B12, e 16F12 sono state previste e sono divulgate come (SEQ. ID NO. 67, 49 e 79 rispettivamente. Regioni costanti di catena pesante di IgG2 e IgG4 (SEQ ID NO: 154 e 155).

Le ripartizioni in FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 sono mostrate in FIG 2A-3D. Sulla base dei dati di sequenza, sono stati determinati i geni della linea germinale da cui ciascuna regione variabile di catena pesante o catena leggera era stata derivata. L'identità dei geni della linea germinale è indicata subito dopo la linea di ibridoma corrispondente nelle FIGG. 2A-3D e ciascuna è rappresentata da una unica SEQ ID NO. FIGG. 2A-3D illustrano anche le sequenze amminoacidiche determinate per gli anticorpi aggiuntivi che erano stati caratterizzati.

ESEMPIO 8

Caratterizzazione del legame di anticorpi a PCSK9

Avendo identificato un certo numero di anticorpi che si legano a PCSK9, sono stati impiegati numerosi approcci per quantificare e caratterizzare ulteriormente la natura del legame. In un aspetto dello studio, è stata effettuata un'analisi di affinità Biacore. In un altro aspetto dello studio, è stata effettuata analisi di affinità KinExA®. I campioni e i tamponi impiegati in questi studi sono presentati nella Tabella 6 sotto riportata.

TABELLA 6

campione	[campione] mg/ml	Tampone	[campione] µm
hPCSK9	1,26	PBS	16,6
mPCSK9 - 8x HIS	1,44	PBS	18,9
cPCSK9-V5-6x HIS	0,22	PBS	2,9
16F12, hu IgG4 anti-PCSK9	4,6	NaOAC 20 mM, pH 5,2, NaCl 50 mM	31,9
21B12, hu IgG4 anti-PCSK9	3,84	NAOAC 10 mM, pH 5,2, saccarosio 9%	27,0
31H4, hu IgG4 anti-PCSK9	3,3	NAOAC 10 mM, pH 5,2, saccarosio 9%	22,9

Misurazioni di affinità con BIAcore®

Analisi di affinità BIAcore® (dispositivo di risonanza plasmonica di superficie, Biacore, Inc., Piscataway, NJ) degli anticorpi 21B12 per PCSK9 descritta in questo Esempio è stata effettuata secondo le istruzioni del produttore.

In breve, esperimenti di risonanza plasmonica di superficie sono stati effettuati, utilizzando biosensori ottici Biacore 2000 (Biacore, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Ciascun singolo anticorpo anti-PCSK9 era immobilizzato su un chip di biosensori CM5 di grado di ricerca mediante accoppiamento amminico ai livelli che davano una massima risposta di legame dell'analita (R_{max}) non superiore a 200 unità di risonanza (RU). La concentrazione di proteina PCSK9 era variata ad intervalli di 2 volte (l'analita) ed è stata iniettata sulla superficie di anticorpi immobilizzati (a una portata di 100 μ l/min per 1,5 minuti). Tampone HBS-P fresco (pH 7,4, Hepes 0,01 M, NaCl 0,15 M, tensioattivo P-20 0,005%, Biacore) integrato con BSA 0,01% era utilizzato quale tampone di legame. Le affinità di legame di ciascun anticorpo anti-PCSK9 sono state misurate in esperimenti separati contro ciascuna delle proteine PCSK9 umana, di topo e di scimmia cinomolga a pH 7,4 (la concentrazione utilizzata era 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 0 nM).

In più, le affinità di legame dell'anticorpo contro PCSK9 umana sono state anche misurate a pH 6,0 con il tampone HBS-P di pH 6,0 (pH 6,0, Hepes 0,01 M, NaCl 0,15 M, tensioattivo P-20 0,005%, Biacore) integrato con BSA 0,01%. Il segnale di legame ottenuto era proporzionale a PCSK9 libera in soluzione. La costante di dissociazione all'equilibrio (K_D) era ottenuta da un'analisi di regressione non lineare delle curve di competizione, usando un modello di legame omogeneo unilaterale a doppia curva (software KinExA®, Sapidyne Instruments Inc., Boise, ID) ($n = 1$ per le corse a pH 6,0). In maniera interessante, gli anticorpi sembravano esibire un'affinità di legame più stretta a un pH inferiore (dove la K_d era 12,5, 7,3 e 29 pM per 31H4, 21B12 e 16F12, rispettivamente).

Parametri cinetici di legame anticorpale includenti k_a (costante di velocità di associazione), k_d (costante di velocità di dissociazione) e K_D (costante di equilibrio di dissociazione) sono stati determinati, utilizzando il programma informatico 3.1 per la valutazione BIA (BIAcore, Inc. Piscataway, NJ). Costanti di equilibrio di dissociazione inferiori indicano una maggiore affinità per l'anticorpo contro PCSK9. I valori di K_D determinati mediante l'analisi di affinità BIAcore® sono presentati in Tabella 7.1, mostrata qui di seguito.

TABELLA 7.1

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

Tabella 7.2 illustra le velocità k_{on} e k_{off} .

TABELLA 7.2

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

Misurazioni di affinità con KinExA®

Un'analisi di affinità KinExA® (Sapidyne Instruments, Inc., Boise, ID) di 16F12 e 31H4 è stata effettuata secondo le istruzioni del produttore. In breve, Reacti-Gel™ (6x) (Pierce) è stato pre-rivestito con una delle proteine PCSK9 umana, di cinomolgo con tag V5 o di topo con tag His e bloccato con BSA. 10 o 100 pM di anticorpo 31H4 e una delle proteine PCSK9 sono stati poi incubati con varie concentrazioni (0,1 pM - 25 nM) di proteine PCSK9 a temperatura ambiente per 8 ore prima di essere fatti passare attraverso biglie rivestite da PCSK9. La quantità di 31H4 legato a biglie è stata quantificata mediante anticorpo anti-IgG (H + L) umano di capra marcato con fluorescenza (Cy5) (Jackson Immuno Research). Il segnale di legame è proporzionale alla concentrazione di 31H4 libero all'equilibrio di legame. La costante di dissociazione all'equilibrio (K_D) è stata ottenuta da una regressione non lineare dei due gruppi di curve di competizione, usando un modello di legame omogeneo unilaterale. Software KinExA® Pro è stato impiegato nell'analisi. Curve di legame generate in questa analisi sono presentate come FIGG. 4A-4F.

Entrambi gli anticorpi 16F12 e 31H4 mostravano un'affinità simile per PCSK9 umana e di cinomolgo, ma un'affinità approssimativamente 10-250 volte minore per PCSK9 di topo. Dei due anticorpi esaminati utilizzando il sistema KinExA, l'anticorpo 31H4 mostrava un'affinità maggiore per entrambe PCSK9 umana e di cinomolgo con K_D 3 e 2 pM, rispettivamente. 16F12 mostrava un'affinità leggermente più debole con K_D 15 pM per PCSK9 umana e K_D 16 pM per PCSK9 di cinomolgo.

I risultati dell'analisi di affinità KinExA® sono riassunti in Tabella 8.1, qui di seguito

riportata.

TABELLA 8.1

	hPCSK9		cPCSK9		mPCSK9	
Campione	K_D (pM)	95% CI	K_D (pM)	95% CI	K_D (pM)	95% CI
31H4.1	3	1~5	2	1~3	500	400~620

In più, SDS PAGE è stata avviata per verificare la qualità e quantità dei campioni ed è mostrato in FIG. 5A. cPCSK9 mostrava circa il 50% in meno sul gel e anche dalla concentrazione di legame attiva calcolata dal saggio KinExA®. Pertanto, la K_D degli mAb contro cPCSK9 è stata regolata come 50% della PCSK9 attiva nel presente.

Un saggio di legame all'equilibrio in soluzione BIAcore è stato utilizzato per misurare i valori di K_D per la ABP 21B12. 21B12.1 mostrava un piccolo segnale, utilizzando il saggio KinExA, pertanto è stato applicato il saggio all'equilibrio in soluzione Biacore. Poiché non si osservava un legame significativo nel legame degli anticorpi alla superficie di PCSK9 immobilizzata, l'anticorpo 21B12 è stato immobilizzato sulla cella di flusso 4 di un chip CM5, utilizzando accoppiamento amminico con densità intorno a 7000 RU. La cella di flusso 3 era utilizzata come controllo di sfondo. 0,3, 1 e 3 nM di PCSK9 umana o PCSK9 di cinomolgo sono stati miscelati con una diluizione seriale di campioni anticorpali 21B12.1 (variava da 0,001 ~ 25 nM) in PBS più BSA 0,1 mg/ml, P20 0,005% . Il legame di PCSK9 libera nelle soluzioni miscelate è stato misurato mediante iniezione sulla superficie anticorpale 21B12.1. 100% di segnale di legame di PCSK9 sulla superficie di 21B12.1 è stato determinato in assenza di mAb nella soluzione. Una diminuita risposta di legame di PCSK9 all'aumentare delle concentrazioni di mAb indicava quel legame di PCSK9 a mAb in soluzione che bloccava PCSK9 nel legarsi alla superficie immobilizzata del peptibody. Rappresentando graficamente il segnale di legame di PCSK9 vs concentrazioni di mAb, è stata calcolata la K_D da tre serie di curve (concentrazione di PCSK9 fissa 0,3, 1 e 3 nM), utilizzando un modello di legame omogeneo unilaterale in un software KinExA Pro™. Sebbene cPCSK9 abbia una concentrazione di proteina inferiore osservata dal saggio KinExA e gel di SDS, la sua concentrazione non era qui regolata, poiché la concentrazione di cPCSK9 non era utilizzata per il calcolo di K_D . I risultati sono illustrati in Tabella 8.2 sotto riportata e nelle FIGG. 5B-5D. FIG. 5B illustra i risultati del saggio all'equilibrio in soluzione per tre differenti concentrazioni di hPCSK9 per hPCSK9. FIG. 5C illustra una

serie simile di risultati per mPCSK9. FIG. 5D illustra i risultati del saggio di cattura Biacore sopra discusso.

TABELLA 8.2

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

ESEMPIO 9

Efficacia di 31H4 e 21B12 nel bloccare il legame PCSK9 D374Y/LDLR

Questo Esempio fornisce valori di IC₅₀ per due degli anticorpi nel bloccare la capacità di PCSK9 D374Y di legarsi al LDLR. Piastre trasparenti da 384 pozzetti (Costar) sono state rivestite con 2 microgrammi/ml di anticorpo anti-recettore per le LDL di capra (R&D Systems) diluiti in tampone A (cacodilato di sodio 100 mM, pH 7,4). Le piastre sono state lavate minuziosamente con tampone A e poi bloccate per 2 ore con tampone B (latte 1% in tampone A). Dopo lavaggio, le piastre sono state incubate per 1,5 ore con 0,4 microgrammi/ml di recettore per le LDL (R&D Systems) diluito in tampone C (tampone B integrato con CaCl₂ 10 mM). In concomitanza con questa incubazione, 20 ng/ml di PCSK9 D374Y biotinilata sono stati incubati con varie concentrazioni dell'anticorpo IgG2 31H4, IgG4 31H4, IgG2 21B12 o IgG4 21B12 che era diluito in tampone A o tampone A da solo (controllo). Le piastre contenenti il recettore per le LDL sono state lavate e la miscela PCSK9 D374Y biotinilata/anticorpo è stata in esse trasferita e le piastre sono state lasciate incubare per 1 ora a temperatura ambiente. Il legame di D374Y biotinilato al recettore per le LDL è stato rilevato mediante incubazione con streptavidina-HRP (Biosource) a una concentrazione di 500 ng/ml in tampone C, seguito da substrato TMB (KPL). Il segnale era sottoposto a quenching con HCl 1N e la assorbanza era letta a 450 nm.

I risultati di questo studio di legame sono mostrati nelle FIGG. 6A-6D. Per riassumere, i valori di IC₅₀ sono stati determinati per ciascun anticorpo e, come trovato, erano 199 pM per IgG2 31H4 (FIG. 6A), 156 pM per IgG4 31H4 (FIG. 6B), 170 pM per IgG2 21B12 (FIG. 6C) e 169 pM per IgG4 21B12 (FIG. 6D).

Gli anticorpi bloccavano anche il legame di PCSK9 di tipo selvatico al LDLR in questo saggio.

ESEMPIO 10

Saggio di captazione cellulare delle LDL

Questo Esempio dimostra la capacità di varie proteine leganti l'antigene di ridurre la

captazione di LDL da parte di cellule. Cellule HepG2 umane sono state seminate in piastre nere, a fondo trasparente da 96 pozzetti (Costar) a una concentrazione di 5×10^5 cellule per pozzetto in terreno DMEM (Mediatech, Inc) integrato con FBS 10% e lasciate incubare a 37°C (CO2 5%) per l'intera notte. Per formare il complesso di PCSK9 e anticorpo, 2 µg/ml di PCSK9 umana D374Y sono stati incubati con varie concentrazioni di anticorpo diluito in tampone di captazione (DMEM con FBS 1%) o tampone di captazione da solo (controllo) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo lavaggio delle cellule con PBS, la miscela di PCSK9 D374Y/anticorpo è stata trasferita alle cellule, cui ha fatto seguito LDL-BODIPY (Invitrogen) diluito in tampone di captazione a una concentrazione finale di 6 µg/ml. Dopo incubazione per 3 ore a 37°C (CO2 5%), le cellule sono state lavate abbondantemente con PBS e il segnale di fluorescenza cellulare è stato rilevato mediante Safire™ (TECAN) a 480-520 nm (eccitazione) e 520-600 nm (emissione).

I risultati del saggio di captazione cellulare sono mostrati nelle FIGG. 7A-7D. Per riassumere, sono stati determinati i valori di IC₅₀ per ciascun anticorpo e, come riscontrato, erano 16,7 nM per IgG2 31H4 (FIG. 7A), 13,3 nM per IgG4 31H4 (FIG. 7B), 13,3 nM per IgG2 21B12 (FIG. 7C) e 18 nM per IgG4 21B12 (FIG. 7D). Questi risultati dimostrano che le proteine leganti l'antigene applicate possono ridurre l'effetto della PCSK9 (D374Y) per bloccare la captazione delle LDL da parte delle cellule. Anche gli anticorpi bloccavano l'effetto di PCSK9 di tipo selvatico in questo studio.

ESEMPIO 11

Effetto abbassante il colesterolo sierico dell'anticorpo 31H4 in uno studio di 6 giorni

Al fine di valutare l'abbassamento di colesterolo sierico totale (TC) in topi di tipo selvatico (WT) tramite terapia anticorpale contro la proteina PCSK9, è stata effettuata la seguente procedura.

Topi WT maschio (ceppo C57BL/6, di 9-10 settimane di età, 17-27 g) ottenuti da Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) sono stati alimentati con dieta usuale (Harland-Teklad, Diet 2918) nel corso di tutta la durata dell'esperimento. Ai topi è stato somministrato anticorpo anti-PCSK9 31H4 (2 mg/ml in PBS) IgG di controllo (2 mg/ml in PBS) a un livello di 10 mg/kg attraverso la vena della coda del topo a T = 0. Topi naive sono stati anche affiancati come gruppo di controllo naive. I gruppi di dosaggio e il tempo in cui è avvenuto il sacrificio sono mostrati in Tabella 9.



TABELLA 9

Gruppo	Trattamento	Punto temporale dopo dosaggio	Numero
1	IgG	8 h	7
2	31H4	8 h	7
3	IgG	24 h	7
4	31H4	24 h	7
5	IgG	72 h	7
6	31H4	72 h	7
7	IgG	144 h	7
8	31H4	144 h	7
9	Naive	n/a	7

I topi sono stati sacrificati con asfissia tramite CO₂ nei punti temporali prestabiliti mostrati in Tabella 9. Sangue è stato raccolto attraverso la vena cava in tubi di Eppendorf ed è stato lasciato coagulare a temperatura ambiente per 30 minuti. I campioni sono stati poi centrifugati in una centrifuga da banco di lavoro a 12000 x g per 10 minuti per separare il siero. Colesterolo totale e C-HDL sierici sono stati misurati, utilizzando un analizzatore clinico Hitachi 912 e Roche/Hitachi TC e kit per C-HDL.

I risultati dell'esperimento sono mostrati in FIGG. 8A-8D. Per riassumere, i topi ai quali era stato somministrato l'anticorpo 31H4 mostravano diminuiti livelli sierici di colesterolo nel corso dell'esperimento (FIG. 8A e FIG. 8B). In più, si è notato che i topi mostravano anche livelli diminuiti di HDL (FIG. 8C e FIG. 8D). Per la FIG. 8A e FIG. 8C, il cambiamento percentuale è in relazione a IgG di controllo nello stesso punto temporale (*P < 0,01, # P < 0,05). Per la FIG. 8B e FIG. 8D, il cambiamento percentuale è in relazione ai livelli sierici di colesterolo totale e HDL misurati in animali naive a t = 0 h (*P < 0,01, # P < 0,05).

Rispetto ai livelli abbassati di HDL, si fa notare che un esperto del ramo apprezzerà che la diminuzione di HDL nei topi non è indicativa del fatto che si verificherà una riduzione di HDL nell'uomo e riflette inoltre solamente che il livello sierico di colesterolo nell'organismo è diminuito. Si fa notare che i topi trasportano la maggior parte di colesterolo sierico in particelle di lipoproteine ad alta densità (HDL), il che è differente dall'uomo che trasporta la maggior parte del colesterolo sierico su particelle LDL. Nei topi, la misurazione del colesterolo sierico totale richiama più strettamente il livello di C-HDL sierico. HDL di topo contiene l'apolipoproteina E (apoE) che è un ligando per il recettore per le LDL (LDLR) e consente di essere ripulito dal LDLR. Così, esaminare le HDL è un indicatore appropriato al presente Esempio nei topi (comprendendo che una diminuzione di HDL non è attesa nell'uomo). Ad esempio, HDL umana, invece, non contiene apoE e non è un ligando per il LDLR. Poiché gli anticorpi contro PCSK9 inducono un aumento dell'espressione di LDLR

nel topo, il fegato può ripulire più HDL e abbassa, pertanto, i livelli sierici di C- HDL.

ESEMPIO 12

Effetto dell'anticorpo 31H4 su livelli di LDLR in uno studio di 6 giorni

Il presente Esempio dimostra che una proteina legante l'antigene altera il livello di LDLR in un soggetto, come previsto, nel tempo. Una analisi Western blot è stata effettuata al fine di accertare l'effetto dell'anticorpo 31H4 su livelli di LDLR. 50-100 mg di tessuto di fegato ottenuto dai topi sacrificati descritti nell'Esempio 13 sono stati omogeneizzati in 0,3 ml di tampone RIPA (Santa Cruz Biotechnology Inc.) contenente inibitore completo della proteasi (Roche). L'omogeneizzato è stato lasciato incubare su ghiaccio per 30 minuti e centrifugato per far sedimentare i detriti cellulari. La concentrazione di proteina nel surnatante è stata misurata, utilizzando reagenti di saggio per le proteine BioRad (BioRad laboratories). 100 µg di proteina sono stati denaturati a 70°C per 10 minuti e separati su gel di gradiente SDS Bis-Tris 4-12% (Invitrogen). Le proteine sono state trasferite ad una membrana di PVDF 0,45 µm (Invitrogen) e bloccate in tampone di lavaggio (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM e Tween 20 0,05%) contenente il 5% di latte scremato per 1 ora a temperatura ambiente. Il blot è stato poi sondato con anticorpo anti-LDLR di topo di capra (R&D system) 1:2000 o anti-β actina (sigma) 1:2000 per 1 ora a temperatura ambiente. Il blot è stato lavato brevemente e lasciato incubare con anti-IgG di capra di bovino-HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 1:2000 o anti-IgG di topo di capra-HRP (Upstate) 1:2000. Dopo incubazione di 1 ora a temperatura ambiente, il blot è stato lavato abbondantemente e bande immunoreattive sono state rilevate, utilizzando il kit ECL plus (Amersham biosciences). Western blot mostrava un incremento dei livelli di proteina LDLR in presenza di anticorpo 31H4, come illustrato in FIG. 9.

ESEMPIO 13

Effetto di abbassamento del colesterolo sierico dell'anticorpo 31H4 in uno studio di 13 giorni

Al fine di valutare l'abbassamento di colesterolo sierico totale (TC) in topi di tipo selvatico (WT) tramite terapia anticorpale contro la proteina PCSK9 in uno studio di 13 giorni, è stata effettuata la seguente procedura.

Topi WT maschio (ceppo C57BL/6, di 9-10 settimane di età, 17-27 g) ottenuti da Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) sono stati alimentati con dieta usuale (Harland-Teklad, Diet 2918) nel corso di tutta la durata dell'esperimento. Ai topi era somministrato anticorpo anti-PCSK9 31H4 (2 mg/ml in PBS) o IgG 2 di controllo (2 mg/ml in PBS) a un livello di 10 mg/kg attraverso la vena della coda di topo in T = 0. Topi naive sono stati anche affiancati

come gruppo di controllo naive.

I gruppi di dosaggio e il tempo in cui è avvenuto il sacrificio sono mostrati in Tabella 10.

Gli animali erano sacrificati e il fegato era estratto e preparato come nell'Esempio 13.

TABELLA 10

Gruppo	Trattamento	Punto temporale dopo dosaggio	Numero	Dose
1	IgG	72 h	6	10 mg/kg
2	31H4	72 h	6	10 mg/kg
3	31H4	72 h	6	1 mg/kg
4	IgG	144 h	6	10 mg/kg
5	31H4	144 h	6	10 mg/kg
6	31H4	144 h	6	1 mg/kg
7	IgG	192 h	6	10 mg/kg
8	31H4	192 h	6	10 mg/kg
9	31H4	192 h	6	1 mg/kg
10	IgG	240 h	6	10 mg/kg
11	31H4	240 h	6	10 mg/kg
12	31H4	240 h	6	10 mg/kg
13	IgG	312 h	6	10 mg/kg
14	31H4	312 h	6	10 mg/kg
15	31H4	312 h	6	1 mg/kg
16	Naive	n/a	6	n/a

Quando l'esperimento di 6 giorni era esteso a uno studio di 13 giorni, lo stesso effetto di abbassamento del colesterolo sierico osservato nello studio di 6 giorni si osservava anche nello studio di 13 giorni. Più specificamente, gli animali trattati con una dose di 10 mg/kg dimostravano un incremento del 31% di colesterolo sierico il giorno 3, che gradualmente ritornava ai livelli di pre-dosaggio per il giorno 13. FIG. 10A illustra i risultati di questo esperimento. FIG. 10C illustra i risultati della ripetizione della procedura sopra riportata con la dose di 10 mg/kg di 31H4 e con un altro anticorpo, 16F12, anche a 10 mg/kg. I gruppi di dosaggio e il tempo in cui è avvenuto il sacrificio sono mostrati in Tabella 11.

TABELLA 11

Gruppo	Trattamento	Punto temporale dopo dosaggio	Numero	Dose
1	IgG	24 h	6	10 mg/kg
2	16F12	24 h	6	10 mg/kg
3	31H4	24 h	6	10 mg/kg
4	IgG	72 h	6	10 mg/kg
5	16F12	72 h	6	10 mg/kg
6	31H4	72 h	6	10 mg/kg
7	IgG	144 h	6	10 mg/kg
8	16F12	144 h	6	10 mg/kg
9	31H4	144 h	6	10 mg/kg
10	IgG	192 h	6	10 mg/kg

11	16F12	192 h	6	10 mg/kg
12	31H4	192 h	6	10 mg/kg
13	IgG2	240 h	6	10 mg/kg
14	16F12	240 h	6	10 mg/kg
15	31H4	240 h	6	10 mg/kg
16	IgG2	312 h	6	10 mg/kg
17	16F12	312 h	6	10 mg/kg
18	31H4	312 h	6	10 mg/kg
19	Naive	n/a	6	10 mg/kg

Come mostrato in FIG. 10C, entrambi 16F12 e 31H4 risultavano in diminuzioni significative e sostanziali del colesterolo totale sierico dopo appena una singola dose e fornivano benefici per più di una settimana (10 giorni o più). I risultati dello studio di 13 giorni ripetuto erano coerenti con i risultati del primo studio di 13 giorni con una diminuzione osservata dei livelli sierici di colesterolo del 26% il giorno 3. Per la FIG. 10A e la FIG. 10B, il cambiamento percentuale è in relazione a IgG di controllo nello stesso punto temporale (*P < 0,01). Per FIG. 10C, il cambiamento percentuale è in relazione a IgG di controllo nello stesso punto temporale (*P < 0,05).

ESEMPIO 14

Effetto dell'anticorpo 31H4 sui livelli di HDL in uno studio di 13 giorni

Sono stati anche esaminati i livelli di HDL per gli animali nell'Esempio 15. I livelli di HDL diminuivano nei topi. Più specificamente, gli animali a cui era stata somministrata una dose di 10 mg/kg dimostravano una diminuzione del 33% dei livelli di HDL il giorno 3, che ritornavano gradualmente a livelli di pre-dosaggio per il giorno 13. FIG. 10B illustra i risultati dell'esperimento. Vi era una diminuzione dei livelli di HDL del 34% il giorno 3. FIG. 10B illustra i risultati dell'esperimento di 13 giorni ripetuto.

Come apprezzerà l'esperto del ramo, sebbene gli anticorpi abbassino le HDL di topo, non ci si aspetta che questo avvenga nell'uomo per via delle differenze delle HDL di uomo e altri organismi (quali topi). Così, la diminuzione di HDL di topo non è indicativa di una diminuzione di HDL nell'uomo.

ESEMPIO 15

La somministrazione ripetuta di anticorpi produce benefici protratti di peptidi leganti
l'antigene

Al fine di verificare che i risultati ottenuti negli Esempi sopra discussi possano essere protratti per ulteriori benefici con dosi aggiuntive, gli esperimenti negli Esempi 15 e 16 sono stati ripetuti con lo schema di dosaggio illustrato in FIG. 11A. I risultati sono visualizzati in

FIG. 11B. Come è possibile osservare nel grafico in FIG. 11B, sebbene entrambe le serie di topi esibissero una diminuzione significativa del colesterolo totale sierico poiché tutti i topi ricevevano un'iniezione iniziale della proteina legante l'antigene 31H4, i topi che ricevevano iniezioni aggiuntive della ABP 31H4 esibivano una riduzione protratta del colesterolo sierico totale, mentre quei topi che ricevevano soltanto l'iniezione di controllo esibivano talvolta un aumento del colesterolo totale sierico. Per la FIG. 11, il cambiamento percentuale è in relazione con gli animali naive a $t = 0$ ore (* $P < 0,01$, ** $P < 0,001$).

I risultati di questo Esempio dimostrano che, differentemente da altri metodi di trattamento del colesterolo, in cui applicazioni ripetute portano a una riduzione dell'efficacia per via di regolazioni biologiche nel soggetto, il presente approccio non sembra patire di questa questione nel periodo di tempo esaminato. Inoltre, questo suggerisce che il ritorno alla linea basale dei livelli sierici di colesterolo totale o di colesterolo HDL, osservato negli Esempi precedenti, non è dovuto a una certa qual resistenza al trattamento che viene sviluppata dal soggetto, piuttosto è imputabile alla deplezione della disponibilità di anticorpo nel soggetto.

ESEMPIO 16

Usi di anticorpi PCSK9 per il trattamento di disturbi correlati al colesterolo

A un paziente umano che esibisce un disturbo correlato al colesterolo (in cui possa essere di beneficio una riduzione del colesterolo (quale colesterolo sierico)) è somministrata una quantità efficace dal punto di vista terapeutico di anticorpo contro PCSK9, 31H4 (o, ad esempio, 21B12). In tempi scanditi periodicamente durante il trattamento, il paziente è monitorato per determinare se i sintomi del disturbo siano regrediti. In seguito a trattamento, si è trovato che pazienti che vanno incontro a trattamento con l'anticorpo contro PCSK9 hanno ridotti livelli sierici di colesterolo a confronto con pazienti che non sono trattati.

ESEMPIO 17

Usi di anticorpi PCSK9 per il trattamento della ipercolesterolemia

A un paziente umano che esibisce sintomi di ipercolesterolemia è somministrata una quantità efficace dal punto di vista terapeutico di anticorpo contro PCSK9, quale 31H4 (o, ad esempio, 21B12). In tempi scanditi periodicamente durante il trattamento, il paziente umano è monitorato per determinare se il livello sierico di colesterolo si sia abbassato. In seguito a trattamento, si è trovato che il paziente ricevente il trattamento con gli anticorpi contro PCSK9 aveva ridotti livelli sierici di colesterolo a confronto con pazienti affetti da artrite non riceventi il trattamento.

ESEMPIO 18

Usi di anticorpi PCSK9 per la prevenzione della malattia coronarica e/o di eventi

cardiovascolari ricorrenti

Viene identificato un paziente umano a rischio di sviluppare malattia coronarica. Al paziente è somministrata una quantità efficace dal punto di vista terapeutico di anticorpo contro PCSK9, quale 31H4 (o, ad esempio, 21B12), da solo, in concomitanza o in sequenza con una statina, ad esempio simvastatina. In tempi scanditi periodicamente durante il trattamento, il paziente umano è monitorato per determinare se il livello sierico di colesterolo totale del paziente cambi. Nel corso del trattamento preventivo, si è trovato che il paziente ricevente il trattamento con gli anticorpi contro PCSK9 ha un ridotto colesterolo sierico, riducendo in tal modo il suo rischio di malattie cardiache coronariche o eventi cardiovascolari ricorrenti a confronto con pazienti non riceventi il trattamento.

ESEMPIO 19

Uso di proteina legante l'antigene PCSK9 per la prevenzione della ipercolesterolemia
Viene identificato un paziente umano che esibisce un rischio di sviluppare ipercolesterolemia tramite analisi della familiarità e/o stile di vita e/o livelli correnti di colesterolo. Al soggetto è regolarmente somministrata (ad esempio, una volta alla settimana) una quantità efficace dal punto di vista terapeutico di anticorpo contro PCSK9, 31H4 (o, ad esempio, 21B12). In tempi scanditi periodicamente durante il trattamento, il paziente è monitorato per determinare se i livelli sierici di colesterolo si siano ridotti. In seguito al trattamento, si è trovato che i soggetti che vanno incontro a trattamento preventivo con l'anticorpo contro PCSK9 hanno livelli abbassati di colesterolo sierico a confronto con soggetti che non sono trattati.

ESEMPIO 20

Uno studio a dose singola ascendente, di fase 1, randomizzato, in doppio cieco, controllato da placebo per valutare sicurezza, tollerabilità, farmacocinetica e farmacodinamica di un anticorpo anti-PCSK9 umano in soggetti sani

Questo studio era uno studio a dose singola ascendente, randomizzato, in doppio cieco, controllato da placebo per valutare sicurezza, tollerabilità, PK, farmacodinamica (PD) (C-LDL) e immunogenicità di un anticorpo anti-PCSK9 umano (l'anticorpo monoclonale 21B12) in soggetti sani. I soggetti sono stati randomizzati in un rapporto 3:1 (21B12: placebo; 8 soggetti per coorte dose per un totale di 56 soggetti in 7 coorti) per l'assegnazione di 21B12 a dosi di 7, 21, 70, 210 o 420 mg SC o corrispondente placebo; o 21B12 a dosi di 21 o 420 mg EV o corrispondente placebo.

Cinquantasei soggetti sono stati randomizzati e hanno ricevuto il prodotto oggetto della ricerca (42 21B12, 14 placebo); 40 soggetti (30 21B12, 10 placebo) hanno ricevuto il

prodotto oggetto della ricerca tramite via di somministrazione SC e 16 soggetti (12 21B12, 4 placebo) hanno ricevuto il prodotto oggetto della ricerca per via EV. Cinquantatré dei 56 soggetti (95%) che avevano ricevuto il prodotto oggetto della ricerca hanno completato lo studio. Tre soggetti che avevano ricevuto 21B12 hanno ritirato il pieno consenso e non hanno completato lo studio.

La popolazione in studio era principalmente composta da uomini (54 [96%]) e aveva un'età media di 31,2 (intervallo: da 20 a 45) anni. L'ottantasei percento dei soggetti era di razza bianca, seguito dal 9% di Ispanici/Latini, 4% di razza nera e 1% di altre razze. I valori medi di C-LDL di linea basale erano simili fra gruppi di trattamento e variavano da 113 a 143 mg/dl.

In questo studio, 21B12 riduceva il C-LDL in media dal 55% al 60% per dosi singole ≥ 70 mg SC, laddove la durata dell'effetto era dose-dipendente. Il nadir del C-LDL si osservava entro 2 settimane di dosaggio. La soppressione completa di PCSK9 si osservava per dosi singole ≥ 70 mg SC, il che si correlava bene con gli effetti osservati sul C-LDL circolante.

L'analisi PK dimostrava che 21B12 esibiva un'eliminazione non lineare (concentrazione-dipendente). La t_{max} media variava da 4 a 6 giorni. Come atteso, la più alta concentrazione massima mediana osservata (C_{max}) e la curva area sotto la concentrazione-tempo dal tempo 0 all'infinito (AUC_{0-inf}) comparivano nel gruppo IV di 420 mg ed erano 139 $\mu\text{g/ml}$ e 1550 $\text{giorno} \cdot \mu\text{g/ml}$, rispettivamente.

Eventi avversi emergenti dal trattamento erano riportati per 29 dei 42 soggetti (69%) che avevano ricevuto 21B12 in qualsiasi dose e per 10 dei 14 soggetti (71%) che aveva ricevuto il placebo. Nessuna correlazione appariva evidente fra incidenza di eventi avversi nei soggetti e dose di 21B12 o fra incidenza di eventi avversi nei soggetti e via di somministrazione di 21B12 (SC vs EV).

Non sono stati riportati effetti avversi gravi e nessun soggetto ha interrotto lo studio per via di un evento avverso. Non vi erano decessi durante lo studio.

Gli eventi avversi correlati a trattamento sono stati riportati per 18 dei 42 soggetti (43%) che ricevevano 21B12 e per 10 dei 14 soggetti (71%) che ricevevano placebo. Nessuna correlazione appariva evidente fra incidenza nei soggetti di effetti avversi correlati a trattamento e dose di 21B12 o fra incidenza nei soggetti di eventi avversi correlati a trattamento e via di somministrazione di 21B12 (SC vs EV).

Non vi erano tendenze indicative di effetti clinicamente importanti di 21B12 su variabili di laboratorio selezionate, elettrocardiogrammi (ECG) o segni vitali.

In questo studio, 21B12 si dimostrava ben tollerato per dosi singole SC e EV sino a 420 mg.

Campioni di siero da soggetti arruolati in questo studio erano esaminati in quanto a presenza (linea basale) o sviluppo (post-trattamento) di anticorpi anti-21B12. I campioni da tutti 42 i soggetti che ricevevano 21B12 erano negativi per anticorpi anti-21B12.

ESEMPIO 21

Uno studio a dose singola ascendente, di fase 1, randomizzato, in doppio cieco, controllato da placebo

Studio a dosi multiple per valutare sicurezza, tollerabilità, farmacocinetica e farmacodinamica di un anticorpo anti-PCSK9 umano in soggetti con iperlipidemia in cura con dosi stabili di una statina.

Questo studio è uno studio a dose multipla ascendente, di fase 1b, randomizzato, in doppio cieco, controllato da placebo, che utilizza un anticorpo anti-PCSK9 umano (anticorpo monoclonale 21B12) in soggetti iperlipidemici (ad esempio ipercolesterolemici) in cura con dosi stabili di una statina. Lo studio aveva sette coorti. Scopi di tutte le coorti includevano la caratterizzazione di sicurezza, tollerabilità e immunogenicità di 21B12 e la caratterizzazione della PK e della PD (C-LDL e PCSK9). Le coorti da 1 a 5 dello studio rappresentavano la porzione con dosi scalate di 21B12 in soggetti ipercolesterolemici in cura con dosi stabili da basse a moderate di statina. I soggetti nelle coorti da 1 a 5 ($n = 8$ per coorte) con C-LDL (70-200 mg/dl) in cura giornaliera stabile con rosuvastatina < 40 mg, atorvastatina < 80 mg o simvastatina 20-80 mg per ≥ 1 mese sono stati randomizzati in un rapporto 3:1 per l'assegnazione di 1 di 5 dosaggi SC di 21B12 (14 o 35 mg QW 6 volte; o 140 mg o 280 mg Q2W 3 volte; o 420 mg Q4W 2 volte) o corrispondente placebo, rispettivamente. La coorte 6 era condotta in soggetti ipercolesterolemici in cura con alte dosi di una statina (atorvastatina 80 mg o rosuvastatina 40 mg). I soggetti in questa coorte ($n = 12$) erano in cura con rosuvastatina 40 mg o atorvastatina 80 mg ed erano randomizzati in un rapporto 3:1 per l'assegnazione di 21B12 (140 mg SC Q2W 3 volte) o di corrispondente placebo, rispettivamente. La corte 7 è stata condotta in soggetti con ipercolesterolemia familiare in eterozigosi (identificata, utilizzando criteri WHO); i soggetti in questa corte ($n = 6$) sono stati randomizzati in un rapporto 2:1 per l'assegnazione di 21B12 (140 mg SC Q2W 3 volte) o corrispondente placebo, rispettivamente. Per chiarezza, la coorte 1 riceveva dosi SC di 14 mg di 21B12 una volta alla settimana, 6 volte. La coorte 2 riceveva dosi SC di 35 mg di 21B12 una volta alla settimana, 6 volte. La coorte 3 riceveva dosi SC di 140 mg di 21B12 una volta a settimane alterne, 3 volte. La coorte 4 riceveva dosi SC di 280 mg di 21B12 una volta a settimane alterne, 3 volte. La coorte 5 riceveva dosi SC di 420 mg di 21B12 ogni 4 settimane, 2 volte.



Risultati preliminari sono stati ottenuti da 40 soggetti che erano stati arruolati e randomizzati per 21B12 o placebo. Di questi 40 soggetti, 28 soggetti avevano ricevuto ≥ 1 dose di prodotto della ricerca (21B12 o placebo) e, pertanto, rappresentavano la serie di analisi preliminari per la sicurezza (in cieco per il trattamento). Dati di sicurezza preliminari in cieco erano disponibili per questi 28 soggetti, tutti i quali erano delle coorti da 1 a 4- Nessun decesso, evento avverso grave o rinuncia iniziale per eventi avversi è stato/a riportato/a. Complessivamente, era stato riportato almeno 1 evento avverso per 15 dei 28 soggetti (54%) che avevano ricevuto ≥ 1 dose di prodotto della ricerca. La maggior parte degli eventi avversi (in cieco per il trattamento) erano riportati per soggetti singoli ad eccezione di affaticamento, artralgia, costipazione e infezione virale delle vie aeree superiori, ciascuno dei quali era riportato per 2 dei 28 soggetti (7%).

Risultati farmacodinamici preliminari (in cieco per il trattamento) erano disponibili per le coorti 1, 2 e 3. Una riduzione del C-LDL circolante, dipendente dalla dose di 21B12, è stata osservata in soggetti in cura con dosi stabili moderate di statine. Il nadir del C-LDL è stato osservato entro 2 settimane dal dosaggio iniziale ed era nell'intervallo dal 60% all'80% di riduzione nella coorte 3 (140 mg Q2W SC 3 volte). Una soppressione quasi completa di PCSK9 è stata osservata nella coorte 3, che si correlava bene con gli effetti osservati su C-LDL circolante.

Nei risultati finali, i soggetti (N = 51) nelle coorti 1-6 sono stati randomizzati per l'assegnazione di 21B12 (N = 39) o placebo (N = 12); 26 soggetti (51%) erano maschi; l'età media (SD) era 58 (7) anni. Nessun decesso o evento avverso grave (AE) è stato riportato e nessun soggetto ha interrotto lo studio per via di un AE. Nessun anticorpo neutralizzante contro 21B12 era rilevato.

Soggetti nelle corti 1-5 in cura con dosi da basse a moderate di statine avevano riduzioni medie di C-LDL sino all'81% vs placebo a una massima riduzione e del 75% vs placebo al termine dell'intervallo di dosaggio (ossia, alla settimana 6) dopo 3 dosi SC bisettimanali di 21B12 e del 66% al termine dell'intervallo di dosaggio (ossia, alla settimana 8) dopo 2 dosi SC ogni 4 settimane. Soggetti nelle corti 1-5 in cura con dosi da basse a moderate di statine avevano riduzioni massime di C-LDL sino all'81% vs placebo a una massima riduzione e del 75% vs placebo al termine dell'intervallo di dosaggio (Figura 14). La grandezza e la durata dell'effetto erano dose-dipendenti. PCSK9 plasmatica non era rilevabile a dosi maggiori. Similmente, al termine dell'intervallo di dosaggio dopo 3 dosi bisettimanali, i soggetti in cura con statine ad alto dosaggio (corte 6) avevano una riduzione media del C-LDL del 63% vs placebo e una riduzione massima del C-LDL del 73% versus placebo

(Figura 15).

Questi dati mostrano che dosi SC ripetute di 21B12 per 6 settimane inducevano una diminuzione di C-LDL circolanti sino all'81% vs placebo, a seconda del regime di dosaggio, in soggetti in cura con statine a dosi da basse a moderate o alte, senza AE gravi. L'effetto abbassante il C-LDL di 21B12 era confrontabile fra i gruppi di statine ad alte dosi e i gruppi di statine a dosi da basse a moderate.

I soggetti nelle coorti 1-5 in cura con dosi da basse a moderate di statine avevano una riduzione media dei livelli di PCSK9 sino al 94% vs placebo al termine dell'intervallo di dosaggio, dati non mostrati. I soggetti nelle coorti 1-5 in cura con dosi da basse a moderate di statine avevano riduzioni medie di ApoB sino al 54% vs placebo al termine dell'intervallo di dosaggio e riduzioni massime che variavano da 48% (35 mg QW) a 59% (140 mg e 280 mg Q2W e 420 mg Q4W) durante lo studio ($p < 0,001$) (Figura 16). In più, soggetti nelle coorti 1-6 in cura con dosi di statine da basse a moderate e alte avevano riduzioni medie di Lp(a) sino al 43% vs placebo al termine dell'intervallo di dosaggio (Figura 17).

Soggetti nella coorte 7 con heFH avevano una riduzione media del C-LDL del 65% vs placebo al termine dell'intervallo di dosaggio (ossia, settimana 6, 2 settimane dopo la terza dose SC bisettimanale di 21B12) e una riduzione massima di C-LDL del 70% versus placebo (Figura 18). Riduzioni di C-LDL durante l'intervallo di dosaggio erano confrontabili con quelle osservate in soggetti non affetti da heFH. Dopo trattamento con 21B12, PCSK9 circolante non era rilevabile in soggetti affetti da heFH.

Soggetti nella coorte 7 con heFH avevano una riduzione media dei valori sierici di PCSK9 del 78% vs placebo al termine dell'intervallo di dosaggio (ossia, settimana 6, 2 settimane dopo la terza dose SC bisettimanale di 21B12) (Figura 19). Soggetti nella coorte 7 con heFH avevano una riduzione media del colesterolo totale sino al 42% vs placebo al termine dell'intervallo di dosaggio (ossia, settimana 6, 2 settimane dopo la terza dose SC bisettimanale di 21B12) e una riduzione massima di colesterolo totale del 47% versus placebo (Figura 20). Soggetti nella coorte 7 con heFH avevano una riduzione media di colesterolo non-HDL del 61% vs placebo al termine dell'intervallo di dosaggio (ossia, settimana 6, 2 settimane dopo la terza dose SC bisettimanale di 21B12) e una riduzione massima di colesterolo non-HDL del 67% versus placebo (Figura 21). Soggetti nella coorte 7 con heFH avevano una riduzione media dei livelli di ApoB sino al 47% vs placebo al termine dell'intervallo di dosaggio (ossia, settimana 6, 2 settimane dopo la terza dose SC bisettimanale di 21B12) e una riduzione massima di ApoB del 57% versus placebo (Figura 22). Soggetti nella coorte 7 con heFH avevano una riduzione media della lipoproteina a

(Lp(a)) del 50% vs placebo al termine dell'intervallo di dosaggio (ossia, settimana 6, 2 settimane dopo la terza dose SC bisettimanale di 21B12) (Figura 23).

Nella coorte 7, 21B12 induceva una diminuzione dei livelli di PCSK9 non legata e abbassava sostanzialmente i livelli di C-LDL circolante in soggetti affetti da heFH e iperlipidemia che stavano ricevendo una terapia standard. La dose bisettimanale esaminata forniva riduzioni di C-LDL in soggetti affetti da heFH che erano confrontabili con quelle in soggetti non affetti da heFH. Non era riportato alcun AE grave.

ESEMPIO 22

Studio in doppio cieco, randomizzato, controllato da placebo per valutare tollerabilità ed efficacia di un anticorpo anti-PCSK9 umano in pazienti con ipercolesterolemia familiare in eterozigosi

Scopo di questo studio è valutare l'effetto di 12 settimane di anticorpo anti-PCSK9 umano sottocute (SC) (anticorpo monoclonale 21B12) a confronto con placebo sul cambio di percentuale dalla linea basale del colesterolo contenuto nelle lipoproteine a bassa densità (C-LDL) in soggetti affetti da ipercolesterolemia familiare in eterozigosi (HeFH).

Questo studio è uno studio clinico sperimentale in doppio cieco, randomizzato, stratificato, controllato da placebo, che valuta sicurezza, tollerabilità ed efficacia dell'anticorpo monoclonale 21B12 in soggetti in cui sia stata posta diagnosi di HeFH. È pianificato un arruolamento totale di 150 soggetti. Soggetti che soddisfano tutti i criteri di inclusione/esclusione saranno randomizzati con una uguale collocazione in 3 gruppi di trattamento: anticorpo monoclonale, 21B12 a 350 mg o 420 mg Q4W SC (una volta ogni 4 settimane, sottocute) o placebo Q4W SC. La randomizzazione sarà stratificata mediante screening del livello di C-LDL (< 130 mg/dl [$3,4$ mmol/l] vs ≥ 130 mg/dl) e uso di ezetimibe alla linea basale (sì vs no). La randomizzazione deve avvenire entro 5 - 10 giorni dalla valutazione di screening del C-LDL utilizzata per determinare l'eligibilità. Anticorpo monoclonale, 21B12, e placebo saranno in modalità in cieco. Le visite previste dallo studio sono alle settimane 2, 4, 8 e 12. La somministrazione finale di anticorpo monoclonale, 21B12, o placebo è alla settimana 8. La visita di fine studio (EOS) e l'ultima valutazione dei lipidi sono alla settimana 12.

Maschi e femmine da ≥ 18 a ≤ 75 anni di età e con una diagnosi di ipercolesterolemia familiare in eterozigosi posta con i criteri diagnostici del Simon Broome Register Group (SBRG) sono eligibili per questo studio. Per l'arruolamento, i soggetti devono essere in cura con una statina approvata con dose(i) stabile(i) di tutti i farmaci regolatori dei lipidi consentiti (ad esempio ezetimibe, resina di sequestro degli acidi biliari, stanoli o niacina



approvata da regolamentazione e immessa sul mercato (ad esempio, Niaspan o Niacor)) per almeno

4 settimane prima dello screening del C-LDL e, secondo l'opinione dell'investigatore, che non richiedano sovratitolazione. C-LDL a digiuno deve essere ≥ 100 mg/dl (2,6 mmol/l) e i trigliceridi a digiuno devono essere ≤ 400 mg/dl (4,5 mmol/l) come da laboratorio centrale al momento dello screening.

Dati preliminari (dati non mostrati) dimostravano che soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media con il metodo dei minimi quadrati (LS) dalla linea basale di C-LDL del 38,46% al termine dell'intervallo di dosaggio e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS di C-LDL dalla linea basale del 45,68%. Soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nelle Lp(a) del 21,69% al termine dell'intervallo di dosaggio e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nelle Lp(a) del 28,23%. Soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano un incremento percentuale medio LS dalla linea basale del C-HDL del 15,39% al termine dell'intervallo di dosaggio e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano un incremento percentuale medio LS dalla linea basale del C-HDL del 6,77%. Soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-VLDL del 17,16% al termine dell'intervallo di dosaggio e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-VLDL del 18,49%. Soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nei trigliceridi del 17,24% al termine dell'intervallo di dosaggio e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nei trigliceridi del 4,56%. Soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel colesterolo non-HDL del 36,16% al termine dell'intervallo di dosaggio e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel colesterolo non-HDL del 41,81%. Infine, soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel colesterolo totale del 24,82% al termine dell'intervallo di dosaggio e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel colesterolo totale del 29,45% (dati non mostrati).

Figura 24 è un grafico che rappresenta i dati di riduzione del C-LDL per le dosi seguenti di 21B12: 70 mg, 105 mg e 140 mg (dosaggio Q2W o una volta ogni due settimane) e 280 mg, 350 mg e 420 (dosaggio Q4W o una volta al mese). Questi dati costituiscono i dati aggregati

dagli studi descritti negli Esempi 22-25). In breve, i dati aggregati mostrano che 140 mg Q2W risultano in una riduzione approssimativa del 60% dalla linea basale del C-LDL alla settimana 12 e in un mantenimento confortevole della riduzione di C-LDL. In più, questi dati mostrano che 420 mg Q4W risultano in una riduzione approssimativa del 56% dalla linea basale del C-LDL alla settimana 12 e in un minore effetto rebound di C-LDL al termine dell'intervallo di dosaggio.

Figure 25A-25D sono grafici a barre che mostrano gli effetti benefici di dosi di 21B12 su Lp(a), C-HDL, trigliceridi e C-VLDL, rispettivamente, derivati dai dati aggregati degli studi descritti negli Esempi 22-25. In più, riduzioni dose-dipendenti dalla linea basale sono state osservate per il colesterolo totale (25-37%, valori $p < 0,001$), C-non HDL (36-53%, valori $p < 0,001$) e ApoB (36-53%, valori $p < 0,001$) (dati non mostrati).

ESEMPIO 23

Studio randomizzato per valutare tollerabilità ed efficacia di un anti-PCSK9 umano

L'anticorpo su C-LDL a confronto con ezetimibe in pazienti ipercolesterolemici rende incapaci di tollerare una dose efficace di un inibitore di HMG-Co-A riduttasi

Scopo di questo studio è valutare l'effetto di 12 settimane di anticorpo anti-PCSK9 umano sottocute (SC) (anticorpo monoclonale 21B12) a confronto con ezetimibe, sul cambiamento percentuale dalla linea basale di colesterolo contenuto nelle lipoproteine a bassa densità (C-LDL) in soggetti ipercolesterolemici incapaci di tollerare una dose efficace di un inibitore di HMG-CoA riduttasi.

Questo studio è uno studio clinico sperimentale a gruppi paralleli, randomizzato, stratificato per l'anticorpo umano anti-PCSK9, anticorpo monoclonale, 21B12. È pianificato di arruolare 150 soggetti. I soggetti che soddisfanno tutti i criteri di inclusione/esclusione saranno randomizzati con eguale sistemazione in 5 gruppi di trattamento: anticorpo monoclonale, 21B12 a 280 mg, 350 mg o 420 mg Q4W SC (una volta ogni 4 settimane, sottocute); ezetimibe a 10 mg giornalmente (QD) orale (PO) con anticorpo monoclonale, 21B12 a 420 mg Q4W SC; o ezetimibe 10 mg QD PO con placebo Q4W SC. La randomizzazione sarà stratificata mediante screening del livello di C-LDL (< 130 mg/dl [$3,4$ mmol/l] vs ≥ 130 mg/dl) e uso di statine alla linea basale (sì vs no). La randomizzazione deve avvenire entro 5 -10 giorni dalla valutazione di screening del C-LDL utilizzata per determinare la elegibilità. Anticorpo monoclonale, 21B12, e placebo saranno in modalità in cieco. Ezetimibe non è in cieco. Le visite previste dallo studio sono alle settimane 2, 4, 8 e 12. La somministrazione finale di anticorpo monoclonale, 21B12, o placebo è alla settimana 8. La visita di fine studio e l'ultima valutazione dei lipidi avvengono alla settimana 12.



Maschi e femmine, ≥ 18 sino a ≤ 75 anni di età sono elegibili per questo studio. I soggetti devono aver tentato almeno con 1 statina ed erano stati incapaci di tollerare qualsiasi dose o aumento della dose di statina al di sopra delle seguenti dosi massimali settimanali totali per via di mialgia o miopatia: atorvastatina ≤ 70 mg, simvastatina ≤ 140 mg, pravastatina ≤ 140 mg, rosuvastatina ≤ 35 mg, lovastatina ≤ 140 mg, fluvastatina ≤ 280 mg. Per le statine non elencate, la dose massimale settimanale totale non deve eccedere 7 volte la più piccola dimensione di compressa disponibile. I sintomi devono essersi risolti, quando la statina è interrotta o la dose ridotta. Se si assumono statine (non eccedenti la dose massima sopra definita), una resina di sequestro degli acidi biliari e/o terapia a base di stanolo, la/e dose/i deve/devono essere stabile/i da almeno 4 settimane prima dello screening del C-LDL. Se il soggetto è in cura con ezetimibe all'inizio dello screening, ezetimibe deve essere interrotto ≥ 4 settimane prima dello screening del C-LDL. A seconda della categoria di rischio (sulla base di obiettivi di trattamento NCEP ATP III), i soggetti devono soddisfare i seguenti criteri di C-LDL a digiuno (tramite laboratorio centrale) al momento dello screening: ≥ 100 mg/dl (2,6 mmol/l) per soggetti in cui sia stata posta diagnosi di malattia coronarica (CHD) o equivalente a rischio di CHD; ≥ 130 mg/dl (3,4 mmol/l) per soggetti in cui non sia stata posta diagnosi di CHD o equivalente a rischio di CHD e 2 o più fattori di rischio; ≥ 160 mg/dl (4,1 mmol/l) per soggetti in cui non sia stata posta diagnosi di CHD o equivalente a rischio di CHD e con 1 o senza fattori di rischio. I trigliceridi a digiuno devono essere ≤ 400 mg/dl (4,5 mmol/l), come determinato da analisi del laboratorio centrale al momento dello screening.

Dati preliminari (dati non mostrati) dimostravano che i soggetti trattati con 280 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-LDL del 38,79% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-LDL del 40,01% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-LDL del 50,63%. Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 280 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nelle Lp(a) del 27,38% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nelle Lp(a) del 16,04% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nelle Lp(a) del 23,84%. Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 280 mg di 21B12 avevano un incremento percentuale medio LS dalla linea basale del C-HDL del 8,62% al



termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano un incremento percentuale medio LS dalla linea basale del C-HDL del 4,62% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano un incremento percentuale medio LS dalla linea basale del C-HDL del 7,55%. Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 280 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-VLDL del 31,02% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-VLDL del 38,14% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-VLDL del 37,27%. Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 280 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nei trigliceridi del 15,35% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nei trigliceridi del 19,22% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nei trigliceridi del 19,55%. Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 280 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel colesterolo totale del 31,03% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel colesterolo totale del 34,46% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel colesterolo totale del 42,23%. Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 280 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-non HDL del 39,92% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-non HDL del 42,86% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-non HDL del 53,49%.

ESEMPIO 24

Studio a intervalli di dose, randomizzato, controllato da placebo ed ezetimibe, per valutare tollerabilità ed efficacia di un anticorpo anti-PCSK9 umano sul C-LDL pazienti ipercolesterolemici con un punteggio di rischio di Framingham a 10 anni del 10% o inferiore

Scopo di questo studio era valutare l'effetto di 12 settimane di anticorpo anti-PCSK9 umano sottocute (SC) (anticorpo monoclonale 21B12) ogni 2 settimane (Q2W) o ogni 4 settimane (Q4W), a confronto con placebo, sul cambiamento percentuale dalla linea basale del

colesterolo contenuto nelle lipoproteine a bassa densità (C-LDL), quando utilizzato come monoterapia in soggetti ipercolesterolemici con un punteggio di rischio di Framingham a 10 anni del 10% o inferiore.

Questo studio era uno studio clinico sperimentale randomizzato, stratificato, a intervalli di dose, a gruppi paralleli, controllato da placebo e da ezetimibe, per l'anticorpo umano anti-PCSK9, anticorpo monoclonale, 21B12, che arruolava 411 soggetti. I soggetti che soddisfacevano tutti i criteri di inclusione/esclusione erano randomizzati con una uguale collocazione in 9 gruppi di trattamento: Da 1 a 6 regimi di dose di anticorpo monoclonale, 21B12 (70 mg, 105 mg o 140 mg Q2W SC o 280 mg, 350 mg o 420 mg Q4W SC (una volta ogni 4 settimane, sottocute), placebo con somministrazione SC di Q2W o Q4W o ezetimibe con somministrazione orale (PO) giornaliera (QD). La randomizzazione era stratificata mediante screening del livello di C-LDL (< 130 mg/dl [$3,4$ mmol/l] vs > 130 mg/dl). La randomizzazione avveniva entro 5 -10 giorni dalla valutazione di screening del C-LDL, utilizzata per determinare l'eleggibilità. Le visite previste dallo studio erano ogni 2 settimane, indipendentemente dal fatto che il soggetto ricevesse trattamento Q2W SC o Q4W o ezetimibe. I 3 gruppi di dose Q2W di anticorpo monoclonale, 21B12, e 1 gruppo placebo Q2W erano in cieco fra loro e i 3 gruppi di dose Q4W e 1 gruppo placebo Q4W erano in cieco fra loro. Ezetimibe non è in cieco. La visita di fine studio e l'ultima stima dei lipidi avvenivano alla settimana 12 per i soggetti con schema Q4W IP o con ezetimibe e alla settimana 14 per soggetti con schema Q2W IP.

Maschi e femmine, ≥ 18 sino a ≤ 75 anni di età erano elegibili per questo studio. C-LDL a digiuno era ≥ 100 mg/dl ($2,6$ mmol/l) e < 190 mg/dl ($4,9$ mmol/l) e i trigliceridi a digiuno ≤ 400 mg/dl ($4,5$ mmol/l) come da laboratorio centrale al momento dello screening. I soggetti avevano un punteggio di rischio di Framingham secondo Adult Treatment Panel III del National Cholesterol Education Panel (NCEP ATP III) del 10% o minore.

Il punto finale primario era il cambiamento percentuale dalla linea basale di C-LDL alla settimana 12. I punti finali secondari includevano cambiamenti di percentuale di apolipoproteina B (ApoB), lipoproteina (a) (Lp(a)) e del rapporto fra colesterolo totale e colesterolo contenuto nelle lipoproteine ad alta densità (HDL). Erano altresì valutate tollerabilità e sicurezza.

Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 70 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione di percentuale media di C-LDL dalla linea basale del 41,21% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 105 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione di percentuale media di C-LDL dalla linea basale del 45,44% al termine

dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 140 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media di C-LDL dalla linea basale del 51,56% (dati non mostrati).

Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 280 mg di 21B12 (Q4W) avevano una riduzione percentuale media di C-LDL dalla linea basale del 37,53% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media di C-LDL dalla linea basale del 42,16% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media di C-LDL dalla linea basale del 47,52% (dati non mostrati).

I dati finali dimostravano che alla settimana 12, soggetti ricevanti 21B12 avevano una riduzione di percentuale media con il metodo dei minimi quadrati (LS) di C-LDL dalla linea basale sino al 51% (Tabella 12); il cambiamento percentuale dalla linea basale per ezetimibe era 14%. Il cambiamento dalla linea basale alla settimana 12 era sino a 72 mg/dl maggiore con 21B12 che con placebo. Soggetti ricevanti 21B12 avevano riduzioni di C-LDL dalla linea basale del 37%- 53% maggiori del placebo e del 37% maggiori di ezetimibe. Le riduzioni medie dalla linea basale per ApoB (sino al 44%), Lp(a) (sino al 29%) e rapporto colesterolo totale/HDL (sino al 38%) erano maggiori con 21B12 che con placebo.

TABELLA 12:

**Cambiamento percentuale alla settimana 12 rispetto alla linea basale nel C-LDL:
21B12 vs ezetimibe o placebo SC**

	Q2W				Q4W				Ezetimibe QD (N = 45)
	Placebo (N = 45)	70 mg (N = 45)	105 mg (N = 46)	140 mg (N = 45)	Placebo (N = 45)	280 mg (N = 45)	350 mg (N = 45)	420 mg (N = 45)	
Cambiamento percentuale medio con il metodo dei minimi quadrati dalla linea basale (%)	- 3,71	- 40,98	- 43,87	- 50,93	4,54	- 39,02	- 43,20	- 47,98	- 14,26
Differenza di trattamento vs placebo (%)	-	- 37,27*	- 40,17*	- 47,23*	-	- 43,57*	- 47,74*	- 52,53*	-
Differenza di trattamento vs ezetimibe (%)	-	- 26,73*	- 29,62*	- 36,68*	-	- 25,17*	- 29,34*	- 34,14*	-

SC: sottocute Q2W: ogni 2 settimane; Q4W: ogni 4 settimane o una volta al mese; QD: giornalmente

* P < 0,001

ESEMPIO 25

Studio a intervalli di dose, in doppio cieco, randomizzato, controllato da placebo per valutare tollerabilità ed efficacia di un anticorpo anti-PCSK9 umano sul C-LDL in

combinazione con inibitori di HMG-Co-A riduttasi in pazienti ipercolesterolemici.

Scopo di questo studio era valutare l'effetto di 12 settimane di anticorpo anti-PCSK9 umano sottocute (SC) (anticorpo monoclonale 21B12) ogni 2 settimane (Q2W) o ogni 4 settimane (Q4W), a confronto con placebo, sul cambiamento percentuale dalla linea basale del colesterolo contenuto nelle lipoproteine a bassa densità (C-LDL), quando utilizzato in aggiunta a inibitore di HMG-Co-A riduttasi (ad esempio, una statina) in soggetti affetti da ipercolesterolemia.

Questo studio è uno studio clinico sperimentale a intervalli di dose, a gruppi paralleli, in doppio cieco, randomizzato, stratificato, controllato da placebo per l'anticorpo umano anti-PCSK9, anticorpo monoclonale, 21B12, che arruola 631 soggetti. Soggetti che sono in cura con dose(i) stabile(i) per almeno 4 settimane di terapia fondata sulle statine con o senza ezetimibe e che soddisfanno tutti i criteri di inclusione/esclusione saranno randomizzati con una eguale collocazione in 8 gruppi di trattamento: anticorpo monoclonale, 21B12 sottocute (SC) (70 mg Q2W, 105 mg Q2W, 140 mg Q2W, 280 mg Q4W, 350 mg Q4W e 420 mg Q4W, placebo Q2W SC o placebo Q4W SC). La randomizzazione sarà stratificata mediante screening del livello di C-LDL (< 130 mg/dl [$3,4$ mmol/l] vs ≥ 130 mg/dl) e uso di ezetimibe alla linea basale (sì vs no). La randomizzazione deve avvenire entro 5 -10 giorni dalla valutazione di screening del C-LDL utilizzata per determinare la elegibilità. Le visite previste dallo studio sono ogni 2 settimane, indipendentemente dal fatto che il soggetto riceva trattamento Q2W SC o Q4W. I 3 gruppi di dose Q2W di anticorpo monoclonale, 21B12, e 1 gruppo placebo Q2W saranno in cieco fra loro e i 3 gruppi di dose Q4W e 1 gruppo placebo Q4W saranno in cieco fra loro. La visita di fine studio e l'ultima stima dei lipidi avvengono alla settimana 12 per i soggetti con schema Q4W IP e alla settimana 14 per soggetti con schema Q2W IP.

Maschi e femmine, ≥ 18 sino a ≤ 80 anni di età sono elegibili per questo studio. Per l'arruolamento,

i soggetti devono essere in cura con una statina, con o senza ezetimibe, con dose(i) per almeno 4 settimane prima dello screening del C-LDL e non richiedenti sovratitolazione. C-LDL a digiuno al momento dello screening deve essere ≥ 85 mg/dl ($2,2$ mmol/l). L'arruolamento di soggetti con C-LDL a digiuno allo screening fra ≥ 85 mg/dl ($2,2$ mmol/l) e < 100 mg/dl ($2,6$ mmol/l) sarà limitato a non più di approssimativamente il 20% di un arruolamento pianificato totale. I trigliceridi a digiuno devono essere ≤ 400 mg/dl ($4,5$ mmol/l), come determinato da analisi del laboratorio centrale al momento dello screening.

Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 70 mg di 21B12 (Q2W) avevano una

riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-LDL del 39,22% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 105 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-LDL del 56,38% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 140 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-LDL del 68,76% (dati non mostrati). Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 70 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nelle Lp(a) del 21,17% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 105 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nelle Lp(a) del 33,41% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 140 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nelle Lp(a) del 33,87% (dati non mostrati). Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 70 mg di 21B12 (Q2W) avevano un incremento percentuale medio LS dalla linea basale del C-HDL del 21,17% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 105 mg di 21B12 (Q2W) avevano un incremento percentuale medio LS dalla linea basale del C-HDL del 6,80% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 140 mg di 21B12 (Q2W) avevano un incremento percentuale medio LS dalla linea basale del C-HDL dell'8,43% (dati non mostrati). Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 70 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-VLDL del 14,84% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 105 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-VLDL del 12,75% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 140 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-VLDL del 45,14% (dati non mostrati). Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 70 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nei trigliceridi del 7,20% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 105 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nei trigliceridi del 5,65% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 140 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nei trigliceridi del 17,60% (dati non mostrati). Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 70 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-non HDL del 36,20% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 105 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-non HDL del 51,20% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 140 mg di 21B12 (Q2W) avevano una

riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-non HDL del 64,61% (dati non mostrati). Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 70 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel colesterolo totale del 26,33% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 105 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel colesterolo totale del 36,91% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 140 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel colesterolo totale del 46,17% (dati non mostrati).

Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 280 mg di 21B12 (Q4W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-LDL del 42,62% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-LDL del 56,84% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-LDL del 52,19% (dati non mostrati). Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 280 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nelle Lp(a) del 22,54% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nelle Lp(a) del 29,43% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nelle Lp(a) del 23,29% (dati non mostrati). Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 280 mg di 21B12 (Q2W) avevano un incremento percentuale medio LS dalla linea basale del C-HDL del 2,17% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di 21B12 (Q2W) avevano un incremento percentuale medio LS dalla linea basale del C-HDL del 6,92% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 (Q2W) avevano un incremento percentuale medio LS dalla linea basale del C-HDL del 7,42% (dati non mostrati). Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 280 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-VLDL del 18,12% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-VLDL del 20,89% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-VLDL del 28,66% (dati non mostrati). Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 280 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nei trigliceridi del 6,75% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di

21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nei trigliceridi del 9,17% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nei trigliceridi del 11,13% (dati non mostrati). Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 280 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-non HDL del 38,89% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-non HDL del 50,83% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel C-non HDL del 48,54% (dati non mostrati). Dati preliminari dimostravano che soggetti trattati con 280 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel colesterolo totale del 28,08% al termine dell'intervallo di dosaggio; soggetti trattati con 350 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel colesterolo totale del 36,04% al termine dell'intervallo di dosaggio; e soggetti trattati con 420 mg di 21B12 (Q2W) avevano una riduzione percentuale media LS dalla linea basale nel colesterolo totale del 42,76% (dati non mostrati).

ESEMPIO 26

ABP PCSK9 sovraregolavano ulteriormente il LDLR in presenza di statine
Questo Esempio dimostra che ABP contro PCSK9 producevano ulteriori aumenti della disponibilità del LDLR, quando utilizzati in presenza di statine a dimostrare che è possibile ottenere ulteriori benefici dall'uso combinato dei due.

Cellule HepG2 sono state seminate in DMEM con siero fetale bovino 10% (FBS) e fatte crescere sino a una confluenza di circa il 90%. Le cellule sono state trattate con quantità identiche di mevinolina (una statina, Sigma) e APB contro PCSK9 (FIGG. 12A-12C) in DMEM con FBS 3% per 48 ore. Sono stati preparati lisati cellulari totali. 50 mg di proteine totali sono stati separati mediante elettroforesi su gel e trasferiti a una membrana di PVDF. Sono stati effettuati immunoblot, utilizzando anticorpo anti-recettore per LDL umano di coniglio (Fitzgerald) o anticorpo anti-b-actina umana di coniglio. I risultati di chemiluminescenza potenziata sono mostrati nei pannelli in alto delle FIGG. 12A-12C. L'intensità delle bande era quantificata mediante software ImageJ e normalizzata tramite b-actina. I livelli relativi di LDLR sono mostrati nei pannelli inferiori delle FIGG. 12A-12C. ABP 21B12 e 31H4 sono anticorpi neutralizzanti la PCSK9, mentre 25A7 è un anticorpo non neutralizzante.

Sono state altresì create cellule HepG2-PCSK9. Queste costituivano una linea cellulare



HepG2 stabile, trasfettata con PCSK9 umana. Le cellule sono state seminate in DMEM con siero fetale bovino 10% (FBS) e fatte crescere sino a una confluenza di circa il 90%. Le cellule sono state trattate con quantità indicate di mevinolina (Sigma) e APB contro PCSK9 (FIGG. 12D-12F) in DMEM con FBS 3% per 48 ore. Sono stati preparati lisati cellulari totali. 50 mg di proteine totali sono stati separati mediante elettroforesi su gel e trasferiti a una membrana di PVDF. Sono stati effettuati immunoblot, utilizzando anticorpo anti-recettore per LDL umano di coniglio (Fitzgerald) o anticorpo anti-b-actina umana di coniglio. I risultati di chemiluminescenza potenziata sono mostrati nei pannelli in alto. L'intensità delle bande era quantificata mediante software ImageJ e normalizzata tramite b-actina.

Come è possibile osservare nei risultati illustrati nelle FIGG. 12A-12F, quantità crescenti di anticorpo neutralizzante e quantità crescenti di statina risultavano generalmente in aumenti del livello di LDLR. Questo incremento di efficacia per livelli crescenti della ABP è in special modo evidente nelle FIGG. 12D-12F, in cui le cellule erano anche trasfettate con PCSK9, consentendo alle ABP di dimostrare la loro efficacia in misura maggiore.

In maniera interessante, come dimostrato dai risultati nel confronto delle FIGG. 12D-12F con 12A-12C, l'influsso delle concentrazioni di ABP sui livelli di LDLR aumentava drasticamente, quando PCSK9 era prodotta dalle cellule. In più, è chiaro che ABP neutralizzanti (21B12 e 31H4) risultavano in un aumento maggiore dei livelli di LDLR, anche in presenza di statine, rispetto alla ABP 25A7.1 (un non-neutralizzante), a dimostrazione della possibilità di ottenere benefici aggiuntivi dall'uso di entrambe le statine e ABP contro PCSK9.

ESEMPIO 27

Sequenze consenso

Sequenze consenso sono state determinate, utilizzando analisi filogenetiche standard delle CDR corrispondenti alle V_H e V_L di ABP anti-PCSK9. Le sequenze consenso sono state determinate, mantenendo le CDR contigue all'interno della stessa sequenza corrispondente a una V_H o V_L . In breve, sequenze amminoacidiche corrispondenti ai domini variabili interi di V_H o V_L sono state convertite in formattazione FASTA per semplicità di elaborazione di allineamenti comparativi e deduzione di filogenie. A seguire, le regioni framework di queste sequenze sono state sostituite con una sequenza linker artificiale ("bbbbbbbbbb" tenenti il posto, costruito aspecifico di acidi nucleici) in modo che l'esame delle sole CDR potesse essere eseguito senza introdurre alcun bias ponderale della posizione amminoacidica dovuto a eventi coincidenti (ad esempio, quali anticorpi non correlati che condividono in modo



fortuito un patrimonio di framework di linea germinale comune), mantenendo al contempo CDR contigue all'interno della stessa sequenza corrispondente a una V_H o V_L . Sequenze V_H o V_L di questo formato sono state in seguito sottoposte a interrogazione di allineamento di similarità di sequenza, utilizzando un programma che impiega un algoritmo simile a ClustalW standard (si veda, Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). È stata impiegata una penalità per creazione di gap di 8,0 unitamente a una penalità per l'estensione di gap di 2,0. Questo programma ha generato allo stesso modo filogrammi (illustrazioni di albero filogenetico) sulla base di allineamenti di similarità di sequenza, servendosi di UPGMA (metodo di raggruppamento a coppie non pesato che fa uso di medie aritmetiche) o metodi neighbor-joining (si veda Saitou and Nei, 1987, Molecular Biology and Evolution 4:406-425) per costruire e illustrare similarità e distinzione di gruppi di sequenze tramite confronto di lunghezze di ramificazione e raggruppamento. Entrambi i metodi producevano risultati simili, ma gli alberi derivati da UPGMA sono stati infine utilizzati, poiché il metodo impiega un insieme di ipotesi più semplici e conservative. Gli alberi derivati da UPGMA sono stati generati, dove gruppi simili di sequenze erano definiti dall'avere meno di 15 sostituzioni per 100 residui (si veda la legenda nelle illustrazioni degli alberi per scala) fra singole sequenze all'interno del gruppo e sono stati utilizzati per definire raccolte di sequenze consenso. I risultati dei confronti sono illustrati in FIG 1. 13A-13J e FIGG. 48-49. In FIG. 13E, i gruppi erano scelti in maniera tale che le sequenze nella catena leggera che costituiscono clade fossero anche un clade nella catena pesante e avessero meno di 15 sostituzioni.

ESEMPIO 28

Preparazione di formulazioni di ABP contro PCSK9

UF/DF - Metodologia di ultrafiltrazione/diafiltrazione

Una sostanza farmacologica, ad esempio anticorpo 21B12 e anticorpo 11F1, è stata sottoposta a scambio di tampone in tampone di formulazione che include stabilizzante, con un sistema di UF/DF Millipore TFF da banco che utilizza una membrana (cellulosa rigenerata, cut-off di peso molecolare 30000), di dimensione 50 cm² filtro Millipore Pellicon XL. La fase di diafiltrazione è stata effettuata sino a che erano scambiati almeno dieci volumi di tampone di diafiltrazione. Una volta completata la fase di diafiltrazione, il sistema UF/DF è stato portato alla modalità di ultrafiltrazione e ciascuna formulazione è stata concentrata sino ai livelli di concentrazione target.

Dopo completamento della fase di UF/DF, la quantità appropriata di polisorbato 20 o 80 è stata aggiunta a ciascuna formulazione da una soluzione madre di polisorbato ("PS")

preparata a fresco 1,0% (p/p) per raggiungere la concentrazione desiderata di polisorbato. Prima di riempire contenitori primari, ciascuna formulazione è stata filtrata in asepsi sotto una cappa a flusso laminare e utilizzando un filtro da 0,2 micron. Il riempimento è stato anch'esso effettuato in asepsi ed è stato effettuato manualmente o con dispositivi automatici, utilizzando l'appropriata strumentazione di riempimento.

ESEMPIO 29

Formulazioni di ABP contro PCSK9 ad alta concentrazione con viscosità ridotta

Per valutare gli effetti di differenti eccipienti sulla viscosità di alte concentrazioni di proteine, è stato utilizzato un saggio di screening di viscosità, stabilità e solubilità per esplorare modulatori di viscosità eccipienti per formulazioni di proteine ad alta concentrazione. Specificamente, la preparazione di tutti i campioni, ad esempio del campione di anticorpo 21B12, è stata effettuata in asepsi sotto una cappa a flusso laminare. La liofilizzazione dei campioni da esaminare consentiva un metodo semplice per ottenere alte concentrazioni di proteine. 1,5 ml di proteina 70 mg/ml (ad esempio, 21B12) sono stati pipettati in fiale di vetro da 3 cc per la liofilizzazione. La liofilizzazione è stata effettuata, utilizzando un ciclo di liofilizzazione generica su una liofilizzazione da laboratorio VirTis. Il tampone di liofilizzazione era L-glutammato 10 mM con saccarosio 1,0%, pH 4,8. I campioni liofilizzati (ad esempio, un campione di 21B12 liofilizzato) sono stati ricostituiti individualmente con approssimativamente 0,65 ml dei tamponi eccipienti mostrati in Tabella 13 sotto riportata, sino a una concentrazione di proteina finale di 150-200 mg/mL. I campioni ricostituiti riposavano per l'intera notte per consentire una dissoluzione completa. La viscosità è stata poi misurata come sotto descritto.

TABELLA 13

Tipo di eccipiente	Livello di eccipiente	pH regolato
Amminoacidi	L-Alanina 150 mM	pH 4,5
	L-Glicina 150 mM	pH 4,2
	L-Lisina 75 mM	pH 4,2
	L-Metionina 150 mM	pH 4,5
	L-Prolina 150 mM	pH 4,2
	L-Serina 150 mM	pH 4,2
	L-Arginina 70 mM	pH 4,5
	L-Serina 150 mM	pH 4,4
Sali	Cloruro di magnesio 30 mM	pH 4,2

	Cloruro di sodio 70 mM	pH 4,2
	Cloruro di calcio 30 mM	pH 4,4
	Solfato di sodio 50 mM	pH 4,1
	Cloruro di zinco 30 mM	pH 4,7
Polioli	150 mM Glycerol	pH 4,5
	Saccarosio 150 mM	pH 4,2
Altro	Carnitina 150 mM	pH 4,8
	Creatinina 150 mM	pH 5,0
	Taurina 150 mM	pH 4,4

I risultati dallo screening di viscosità, stabilità, solubilità mostravano cambiamenti di viscosità di 21B12 dopo aggiunta di vari eccipienti (Figura 26). Non tutti gli eccipienti utilizzati a fini di screening risultavano in un abbassamento della viscosità della soluzione; l'aggiunzione di L-alanina, glicerolo, solfato di sodio, saccarosio e cloruro di zinco risultava in una viscosità molto maggiore a confronto con il campione di controllo. Numerosi eccipienti utilizzati nello screening si dimostravano buoni candidati di modulazione della viscosità, ad esempio L-arginina, carnitina, creatinina, L-metionina e taurina.

Per valutare gli effetti di differenti formulazioni sulla viscosità di una specifica ABP contro PCSK9, le composizioni di 21B12 sono state formulate in sei formulazioni differenti, mostrate in Tabella 29.2 qui più avanti riportata. La concentrazione di 21B12 in tutte le formulazioni era 134 mg/ml. Le composizioni erano versate in fiale sino a un volume finale di 1,0 ml. Le composizioni sono state lasciate incubare a temperatura ambiente (ossia, 25°C).

Dialisi e concentrazione di 21B12

La rimozione del saccarosio da 21B12 originariamente in acetato di sodio 10 mM, saccarosio 9,0% (p/v) è stata perseguita tramite dialisi, aggiungendo approssimativamente 10 ml di 21B12 a cassette di dialisi Pierce Slide-A-Lyzer (Rockford, IL) e dializzando contro 2 l di tampone a 4°C per 3 cicli (2 ore x 2 e 16 ore x 1) per uno scambio completo del tampone. Il tampone per la dialisi conteneva acetato di sodio 10 mM (prodotto da acido acetico) a pH 5,0. Tutti i campioni erano successivamente concentrati, utilizzando dispositivi Amicon UltraPrep Millipore (Billerica, MA) in una centrifuga 6R Beckman Coulter Allegra (Fullerton, California) fatta funzionare a 3000 rpm sino a che il volume di campione non fosse leggermente al di sotto del volume richiesto per la concentrazione desiderata.

La determinazione della concentrazione è stata poi condotta, misurando l'assorbanza a

A280, servendosi di uno spettrofotometro Agilent 8453 (Santa Clara, California). La concentrazione di proteina è stata calcolata, utilizzando l'appropriato coefficiente di estinzione. Quantità appropriata di tampone è stata poi aggiunta al campione per diluirlo e riportarlo alla concentrazione desiderata ed è stata condotta un'altra A280 per ottenere la concentrazione finale per l'esperimento.

Addizione di stabilizzanti che possono anche agire per abbassare la viscosità:

Eccipienti, quali prolina, alcol benzilico, creatinina, metionina, taurina, ecc., sono stati esaminati nel tentativo di abbassare la viscosità. Questi eccipienti sono stati aggiunti individualmente ai campioni di formulazione di 21B12 derivati dalle soluzioni madre ad alta concentrazione.

Misurazioni di viscosità

La viscosità è stata misurata, utilizzando viscosimetro a cono e piastra Brookfield LV-DVII (Middleboro, Massachusetts) con un perno CPE-40, facendo corrispondere la temperatura della tazza del campione regolata da un bagno di acqua circolante a 25°C costanti. 500 µl di campione sono stati aggiunti alla tazza del campione con pipettatrice a dislocazione positiva. Dopo che la tazza contenente il campione è stata fissata, la velocità di rotazione del perno è stata gradualmente aumentata sino ad ottenere un momento torcente di circa 80%. A questo punto, la velocità di rotazione è stata fermata ed è stata generata una lettura di viscosità tramite software Rheocalc.

TABELLA 14

Tampone	Stabilizzante	Stabilizzante/eccipienti aggiunti per abbassare la viscosità	Viscosità (cP)
Acetato di Na 10 mM			42,4
Acetato di Na 10 mM	Saccarosio 9,0%	L-prolina 2% (174 mM)	20,3
Acetato di Na 10 mM	Saccarosio 9,0%	L-prolina 3% (261 mM)	17,9
Acetato di Na 10 mM	Saccarosio 9,0%	Alcol benzilico 3%	17,8
Acetato di Na 10 mM	Saccarosio 9,0%	Creatinina 150 mM	11,97

Acetato di Na 10 mM	Saccarosio 9,0%	L-Metionina 150 mM	16,0
Acetato di Na 10 mM	Saccarosio 9,0%	L-aurina 150 mM	16,8

I risultati mostrano che L-prolina, alcol benzilico, creatinina, metionina e taurina avevano tutti un effetto significativo di abbassamento della viscosità in presenza di alte concentrazioni di ABP contro PCSK9, 21B12 (si veda Tabella 14).

Per valutare ulteriormente gli effetti di differenti formulazioni su una specifica ABP contro PCSK9, le composizioni di 21B12 sono state formulate in formulazioni differenti, mostrate in Tabella 15 qui più avanti riportata. Le formulazioni rientrano in tre gruppi: (1) una serie di varie concentrazioni di 21B12 in tampone di acetato di sodio 10 mM, pH 5,2, (2) una serie di varie concentrazioni di 21B12 in tampone di acetato di sodio 10 mM, pH 5,2 con spike di L-prolina 3% (approssimativamente 261 mM) in ciascun campione, e (3) una serie di campioni 21B12 concentrati a circa 117-134 mg/ml in tampone di acetato di sodio 10 mM a differenti livelli di pH (da 4,0 a 5,5) più due campioni in tampone acetato di sodio 10 mM, pH 5,2 con NaCl o una combinazione di L-metionina/alcol benzilico aggiunta.

TABELLA 15

Conc. di 21B12 (mg/ml)	Formulazione	Eccipienti aggiuntivi	Viscosità (Cp) @ 25°C	Viscosità (Cp) @ 40°C	Osmolalità (mOsmol/kg)
76	Acetato di Na 10 mM, pH 5,2	N/A	2,84		53
104	Acetato di Na 10 mM, pH 5,2	N/A	7,1		57
126	Acetato di Na 10 mM, pH 5,2	N/A	16	8,9	58
154	Acetato di Na 10 mM, pH 5,2	N/A	101	49	Non congelava
73	Acetato di Na 10 mM, pH 5,2	Prolina + 3%	2,6		253
104	Acetato di Na 10 mM, pH 5,2	Prolina + 3%	5		252
122	Acetato di Na 10 mM, pH 5,2	+ Prolina 3%	8,8		274

148	Acetato di Na 10 mM, pH 5,2	+ Prolina 3%	24,4	9,5	301
125	Acetato di Na 10 mM, pH 5,2	+ NaCl 150 mM	11	6,6	346
134	Acetato di Na 10 mM, pH 4	N/A	13,3	8,87	59
117	Acetato di Na 10 mM, pH 4,5	N/A	10,8	6	59
130	Acetato di Na 10 mM, pH 5	N/A	16,2	7,1	59
133	Acetato di Na 10 mM, pH 5,5	N/A	23	12,6	64
134	Acetato di Na 10 mM, pH 5,5	+ metionina 150 mM e alcol benzilico 3%	6,5		520

I risultati mostrano che L-prolina aveva un effetto significativo di abbassamento della viscosità in presenza di alte concentrazioni di ABP contro PCSK9, 21B12 (si veda Figura 27).

Per valutare ulteriormente ancora gli effetti di differenti formulazioni su una specifica ABP contro PCSK9, le composizioni di 21B12 sono state formulate in formulazioni differenti, mostrate in Tabella 16 qui più avanti riportata.

TABELLA 16

Conc. di 21B12 (mg/ml)	Formulazione	Eccipienti	Viscosità (Cp) @ 25°C	Osmolalità (mOsmol/kg)
116	Acetato di sodio 10 mM, pH 4,8	N/A	10,4	72
116	Acetato di sodio 10 mM, pH 4,8	Metionina 50 mM + alcol benzilico 2%	7	329
116	Acetato di sodio 10 mM, pH 4,8	Arginina 150 mM	3,7	241

116	Acetato di sodio 10 mM, pH 4,8	Prolina 2% + alcol benzilico 1%	7	313
116	Acetato di sodio 10 mM, pH 4,8	Prolina 1,5% + alcol benzilico 1%	7,3	277

I risultati mostrano che le formulazioni di 21B12, formulate con prolina 1,5% o prolina 2,0% (approssimativamente 131 nM - prolina 174 mM) e alcol benzilico 1% avevano un effetto significativo di abbassamento della viscosità in presenza di alte concentrazioni di ABP contro PCSK9, 21B12.

Per valutare ulteriormente ancora gli effetti di differenti formulazioni su una specifica ABP contro PCSK9, le composizioni di 21B12 sono state formulate in formulazioni differenti, mostrate in Tabella 17 qui sotto riportata.

TABLE 17:

Final Excipient Buffers	Final Ave A280 21B12 Conc (mg/mL)	Viscosity (cP) @ 25C	Shear Stress (Pa) @ 25C	Shear Rate (1/sec) @ 25C
#1 10 mM sodium acetate, 9% Sucrose pH 5.2	79	3.43	18.50	540
	96	4.97	18.60	375
	110	7.68	18.44	240
	166	223.19	18.40	8.25
#2 10 mM sodium acetate, 125 mM Arginine, 3% Sucrose pH 5.0	89	4.80	18.00	375
	105	5.97	18.30	307.5
	122	9.10	18.40	202.5
	150	19.31	18.80	97.5
	167	40.10	18.10	45
#3 10 mM sodium acetate, 100 mM Methionine, 4% Sucrose pH 5.0	195	193.80	18.90	9.75
	85	3.20	18.00	562.5
	106	4.89	18.30	375
	122	7.85	18.90	240
	139	13.55	18.30	135
	168	121.22	18.20	15
#4 10 mM sodium acetate, 250 mM Proline pH 5.0	193	309.56	18.60	6
	85	3.20	18.00	562.5
	108	4.57	18.85	412.5
	125	7.61	18.27	240
	139	13.54	18.30	135
	180	133.73	19.00	14.3
#4 10 mM sodium acetate, 250 mM Proline pH 5.0	203	323.35	19.40	6

"TABLE" = TABELLA

"Final Excipient Buffers" = "Tamponi negli eccipienti finali"

"10 mM sodium acetate, 9% Sucrose" = "Acetato di sodio 10 mM, saccarosio 9%"

"10 mM sodium acetate, 125 mM Arginine, 3% Sucrose" = "Acetato di sodio 10 mM, arginina 125 mM, saccarosio 3%"

"10 mM sodium acetate, 125 mM Arginine, 3% Sucrose" = "Acetato di sodio 10 mM, metionina 100 mM, saccarosio 4%"

"Final Ave A280 21B12 Conc" = "Conc. finale di Ave A280 21B12"

"Viscosity (cP) @ 25C" = "Viscosità (cP) @ 25°C"

"Shear Stress (Pa) @ 25C" = "Sforzo di taglio (Pa) @ 25°C"

"Shear Rate (1/sec) @ 25C" = "Velocità di taglio (1/sec) @ 25°C"

I risultati mostrano la capacità di conseguire alte concentrazioni di proteina 21B12 che presenta una viscosità ridotta con formulazioni aventi specifici stabilizzanti/eccipienti (si vedano le FIGG. 28A-28D). Specificamente, FIG. 28A è un grafico che mostra la viscosità di varie concentrazioni di anticorpo anti-PCSK9, 21B12, in una formulazione comprendente acetato di sodio 10 mM e saccarosio 9% pH 5,2 a 25°C e 40°C.

Figura 28B è un grafico che mostra la viscosità di varie concentrazioni di anticorpo anti-PCSK9, 21B12, in una formulazione comprendente acetato di sodio 10 mM e saccarosio 9% pH 5,2 a 25°C e 40°C, a confronto con una formulazione comprendente acetato di sodio 10 mM, arginina 125 mM e saccarosio 3% pH 5,0 a 25°C e 40°C.

Figura 28C è un grafico che mostra la viscosità di varie concentrazioni di anticorpo anti-PCSK9, 21B12, in una formulazione comprendente acetato di sodio 10 mM e saccarosio 9% pH 5,2 a 25°C e 40°C, a confronto con una formulazione comprendente acetato di sodio 10 mM, metionina 100 mM e saccarosio 4% pH 5,0 a 25°C e 40°C.

Figura 28D è un grafico che mostra la viscosità di varie concentrazioni di anticorpo anti-PCSK9, 21B12, in una formulazione comprendente acetato di sodio 10 mM e saccarosio 9% pH 5,2 a 25°C e 40°C, a confronto con una formulazione comprendente acetato di sodio 10 mM e prolina 250 mM, pH 5,0 a 25°C e 40°C.

ESEMPIO 30

Studi di viscosità di 11F1 per alte concentrazioni

Tabella 30 mostra la viscosità dell'anticorpo 11F1 a 25 gradi Celsius per varie concentrazioni anticorpali e in varie formulazioni. As.

Una soluzione madre ad alta concentrazione di 11F1 è stata preparata in maniera simile a come descritto per 21B12 nell'Esempio 29 sopra trattato. La determinazione della concentrazione è stata poi condotta, misurando l'assorbanza a A280, servendosi di uno spettrofotometro Agilent 8453 (Santa Clara, California). La concentrazione di proteina è stata calcolata, utilizzando l'appropriato coefficiente di estinzione. Quantità appropriata di tampone è stata poi aggiunta al campione per diluirlo e riportarlo alla concentrazione desiderata ed è stata condotta un'altra A280 per ottenere la concentrazione finale per l'esperimento. Eccipienti sono stati aggiunti individualmente ai campioni di formulazione



11F1 derivati dalle soluzioni madre ad alta concentrazione.

La viscosità è stata misurata, utilizzando un viscosimetro a cono e piastra Brookfield LV-DVII (Middleboro, Massachusetts) con un perno CPE-40, facendo corrispondere la temperatura della tazza del campione regolata da un bagno di acqua circolante a 25°C costanti. 500 µl di campione sono stati aggiunti alla tazza del campione con pipettatrice a dislocazione positiva. Dopo che la tazza contenente il campione è stata fissata, la velocità di rotazione del perno è stata gradualmente aumentata sino ad ottenere un momento torcente di circa 80%. A questo punto, la velocità di rotazione è stata fermata ed è stata generata una lettura di viscosità tramite software Rheocalc.

Formulazioni di proteine ad alta concentrazione sono state talvolta misurate, utilizzando un tipo differente di viscosimetro, un MCR300 modello Anton Paar Physica con un perno CP50-1. Un campione di 600 µl è utilizzato in questo strumento e per calcolare la viscosità della soluzione è stato utilizzato software Rheoplus versione 3.4. Non vi era una grande differenza nelle misurazioni, utilizzando o l'uno o l'altro viscosimetro.

TABLE 30

Final Excipient Buffers	Final Ave A280 11F1 Conc (mg/mL)	Viscosity (cP) @ 25C
10 mM sodium acetate, 9% Sucrose 0.01% Poly Sorbate ("PS") 20,pH 5.2	133	8
	145	14
	172	23
	186	45
	191	53
	224	133
10 mM sodium acetate, 150 mM Methionine, 3% Sucrose, 0.01% PS 20, pH 5.2	147	13
	162	18
	192	31
	212	54
10 mM sodium acetate, 250 mM Proline , 0.01% PS 20, pH 5.0	139	10
	170	18
	196	36
	212	47

10 mM sodium acetate, 9% Sucrose, 100 mM Arginine, pH 5.2	211	26
10 mM sodium acetate, 9% Sucrose, 150 mM sodium chloride, pH 5.2	211	62
10 mM sodium acetate, 9% Sucrose, 150 mM Glycine, pH 5.2	211	45
10 mM sodium acetate, 9% Sucrose, 150 mM Serine, pH 5.2	211	48
10 mM sodium acetate, 9% Sucrose, 150 mM Alanine, pH 5.2	211	43
10 mM sodium acetate, 9% Sucrose, pH 5.2	211	73
10 mM sodium acetate, pH 5.2	211	58

“TABLE” = TABELLA

“Final Excipient Buffers” = “Tamponi negli eccipienti finali”

“Final Ave A280 11F1 Conc” = “Conc. finale di Ave A280 11F1”

“Viscosity (cP) @ 25C” = “Viscosità (cP) @ 25°C”

“10 mM sodium acetate, 9% Sucrose, 0.01% Poly Sorbate (“PS”), pH 5.2” = “Acetato di sodio 10 mM, saccarosio 9%, polisorbato 0,01% (“PS”), pH 5,2”

“10 mM sodium acetate, 150 mM Methionine, 3% Sucrose, 0.01% PS 20, pH 5.2” = “Acetato di sodio 10 mM, metionina 150 mM, saccarosio 3%, PS 20 0,01%, pH 5,2”

“10 mM sodium acetate, 250 mM Proline, 0.01% PS 20, pH 5.0” = “Acetato di sodio 10 mM, prolina 250 mM, PS 20 0,01%, pH 5,0”

“10 mM sodium acetate, 9% Sucrose, 100 mM Arginine, pH 5.2” = “Acetato di sodio 10 mM, saccarosio 9%, arginina 100 mM, pH 5,2”

“10 mM sodium acetate, 9% Sucrose, 150 mM sodium chloride, pH 5.2” = “Acetato di sodio 10 mM, saccarosio 9%, cloruro di sodio 150 mM, pH 5,2”

“10 mM sodium acetate, 9% Sucrose, 150 mM Glycine, pH 5.2” = “Acetato di sodio 10 mM, saccarosio 9%, glicina 150 mM, pH 5,2”

“10 mM sodium acetate, 9% Sucrose, 150 mM Serine, pH 5.2” = “Acetato di sodio 10 mM, saccarosio 9%, serina 150 mM, pH 5,2”

“10 mM sodium acetate, 9% Sucrose, 150 mM Alanine, pH 5.2” = “Acetato di sodio 10 mM, saccarosio 9%, alanina 150 mM, pH 5,2”

“10 mM sodium acetate, 9% Sucrose, pH 5.2” = “Acetato di sodio 10 mM, saccarosio 9%, pH 5,2”

“10 mM sodium acetate, pH 5,2” = “Acetato di sodio 10 mM, pH 5,2”

I risultati mostrati in Tabella 30 dimostrano la capacità di conseguire alte concentrazioni di anticorpo 11F1 con viscosità relativamente bassa in formulazioni aventi specifici stabilizzanti/eccipienti. Formulazioni comprendenti gli stabilizzanti metionina, prolina, arginina, glicina, serina e alanina esibivano una viscosità particolarmente minore.

ESEMPIO 31

Studio di stabilità di formulazioni di ABP contro PCSK9 ad alta concentrazione
Per valutare ulteriormente gli effetti della stabilità su formulazioni di ABP contro PCSK9 ad

alto contenuto di proteina, le composizioni di 21B12 sono state formulate in formulazioni differenti, mostrate in Tabella 31.1 qui più avanti riportata. Le formulazioni sono state lasciate incubare nei contenitori indicati a -30°C o 4°C per 0 settimane, 1 mese, 2 mesi, 3 mesi e 6 mesi, e 1 anno. Per ciascuna formulazione in ciascun punto temporale, un campione è stato rimosso da ciascun pacchetto per monitorare il monomero anticorpale mediante HPLC a esclusione dimensionale (SEC-HPLC) nativa e rilevamento di particelle subvisibili mediante rilevamento tramite oscuramento della luce (HIAC).

Table 31.1

	21B12 Conc (mg/mL)	Fill Vol. (mL)	Package	Buffer	Excipients	Polysorbate 80	Target pH
1	110	3.0	5cc Vial	10 mM Na acetate	9.0% Sucrose	0.010%	5.2
2	120	3.0	5cc Vial	10 mM Na acetate	100 mM Methionine, 4% Sucrose	0.010%	5.0
3	120	3.0	5cc Vial	10 mM Na acetate	250 mM Proline	0.010%	5.0
4	110	1.0	BD Glass Syringe	10 mM Na acetate	9.0% Sucrose	0.010%	5.2
5	120	1.0	BD Glass Syringe	10 mM Na acetate	100 mM Methionine, 4% Sucrose	0.010%	5.0
6	120	1.0	BD Glass Syringe	10 mM Na acetate	250 mM Proline	0.010%	5.0
7	110	1.2	CZ Plastic Syringe	10 mM Na acetate	9.0% Sucrose	0.010%	5.2
8	120	1.2	CZ Plastic Syringe	10 mM Na acetate	100 mM Methionine, 4% Sucrose	0.010%	5.0
9	120	1.2	CZ Plastic Syringe	10 mM Na acetate	250 mM Proline	0.010%	5.0

“Table” = “Tabella”

“Formulations” = “Formulazioni”

“21B12 Conc” = “Conc di 21B12”

“Fill Vol.” = “Vol di riempimento”

“Package” = “Pacchetto”

“Buffer” = “Tampone”

“Excipients” = “Eccipienti”

“Polysorbate 80” = “Polisorbato 80”

“Target pH” = “pH target”

“5cc Vial” = “Fiala da 5 cc”

"BD Glass Syringe" = "Siringa di vetro BD"

"CZ Plastic Syringe" = "Siringa di plastica CZ"

"10 mM Na acetate" = "Acetato di Na 10 mM"

"9.0% Sucrose" = "Saccarosio 9,0%"

"100 mM Methionine, 4% Sucrose" = "Metionina 100 mM, Saccarosio 4%"

"250 mM Proline" = "Prolina 250 mM"

SEC-HPLC:

SEC-HPLC separa le proteine sulla base di differenze dei loro volumi idrodinamici. Molecole con volumi di proteine idrodinamici più grandi eluiscono prima di molecole con volumi più piccoli. SEC-HPLC nativa è stata effettuata, utilizzando una colonna 7,8 mm x 300 mm TSK-GEL G3000SWXL (Tosoh Bioscience) con dimensione particellare di 5 μ m su una HPLC Agilent con un rilevatore di lunghezze d'onda variabili. La fase mobile era fosfato di sodio 100 mM, cloruro di sodio 250 mM, pH 6,8 $\pm$ 0,1. La portata era di 0,5 ml/minuto. L'eluato di colonna è stato monitorato a 280 nm. Aree di picco integrate nei cromatogrammi sono state utilizzate per quantificare le quantità di specie monomeriche e ad alto peso molecolare.

Table 31.2:

Formulations	%HMW at -30C				%HMW at 4C					
	T=0	T=1M	T=6M	T=1Y	T=0	T=1M	T=2M	T=3M	T=6M	T=1Y
1	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.01	0.03	0.06	0.07
2	0.06	0.15	0.12	0.15	0.06	0.06	0.03	0.05	0.06	0.06
3	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.01	0.02	0.02	0.07
4	0.04	0.05	0.09	0.05	0.04	0.05	0.01	0.04	0.06	0.09
5	0.06	0.20	0.24	0.21	0.06	0.06	0.03	0.05	0.01	0.07
6	0.04	0.04	0.1	0.05	0.04	0.03	0.01	0.03	0.1	0.07
7	0.04	0.04	0.09	0.06	0.04	0.05	0.01	0.03	0.07	0.09
8	0.06	0.18	0.19	0.17	0.06	0.06	0.03	0.05	0.1	0.06
9	0.04	0.04	0.02	0.05	0.04	0.04	0.01	0.03	0.06	0.08

"Table" = "Tabella"

"%HMW at -30C" = "% di HMW a -30°C"

"%HMW at 4C" = "% di HMW a 4°C"

"Formulations" = "Formulazioni"

Tabella 31.2 mostra i risultati di un'analisi SEC-HPLC nativa di formulazioni di 21B12 elencate in Tabella 31.1 lasciate incubare a X°C per 0 settimane, 1 mese, 2 mesi, 3 mesi e 6 mesi. "% di HMW" riflette la quantità di monomero di 21B12 ad alto peso molecolare in un campione. Questi risultati indicano che non si osservava alcuna questione di formulazione dopo 6 mesi; tuttavia, alcune specie ad alto peso molecolare di fatto aumentavano nella formulazione di metionina (ossia, le formulazioni 2, 5 e 8).

Rilevamento di particelle subvisibili mediante oscuramento della luce (HIAC):

Un sistema di conteggio delle particelle di origine liquida elettronico (HIAC/Royco 9703 o equivalente), contenente un sensore di oscuramento della luce (HIAC/Royco HRLD-150 o equivalente) con un campionatore di liquidi, quantifica il numero di particelle e il loro intervallo dimensionale in un dato campione in esame. Quando le particelle in un liquido passano fra la sorgente luminosa e il rilevatore, esse riducono od "oscurano" il fascio di luce che cade sul rilevatore. Quando la concentrazione di particelle ricade all'interno dell'intervallo normale del sensore, queste particelle sono rilevate una ad una. Il passaggio di ciascuna particella attraverso la zona di rilevamento riduce la luce incidente sul fotorilevatore e la tensione in uscita del fotorilevatore è momentaneamente ridotta. I cambiamenti di tensione si registrano come impulsi elettrici che sono convertiti dallo strumento nel numero di particelle presenti. Il metodo è aspecifico e misura le particelle indipendentemente dalla loro origine. Le dimensioni particellari che sono state monitorate erano di 10 µm e 25 µm.

In questo Esempio, l'analisi HIAC è stata effettuata, utilizzando campioni che erano stati stoccati a 4°C. Specificamente, i campioni di formulazione di 21B12 in Tabella 31.1 erano sottoposti a vuoto (anche chiamato "degassaggio") al fine di rimuovere bolle d'aria che avrebbero potuto essere rilevate come particelle nel sistema di conteggio delle particelle. Per i campioni di 21B12, il metodo era di sottoporre i campioni a vuoto a 75 Torr per un tempo da 1 a 2 ore. Il conteggio delle particelle è stato effettuato entro 2 ore dal completamento del processo di degassaggio.

Figura 29A e 29B mostra i risultati dei saggi HIAC per le formulazioni sopra identificate, lasciati incubare in contenitori per 0 settimane, 1 mese, 2 mesi, 3 mesi e 6 mesi. Sono state contate particelle di 10 µm e 25 µm. Le Figure 29A e 29B dimostrano che tutte le formulazioni di 21B12 erano stabili, come misurato con HIAC. Sebbene le formulazioni in siringhe di vetro, ossia le formulazioni 4-6, mostrassero livelli maggiori di particelle attraverso la concentrazione e la formulazione di proteina, quelle conte di particelle sono al



di sotto dei limiti USP per ciascuna dimensione particellare (10 µm e 25 µm). Il limite USP per particelle di 10 µm è 6000 per contenitore e per particelle da 25 µm è di 600 per contenitore.

ESEMPIO 32

Studi di stabilità di 11F1

Per studiare formulazioni ad alta concentrazione (150 mg/ml) di 11F1, sono state realizzate numerose formulazioni, utilizzando candidati eccipienti, come indicato in Tabella 32A di seguito riportata. Le formulazioni erano stoccate nei contenitori indicati a -30 °C o 4°C per almeno sei mesi.

Tabella 32A: Formulazioni studiate

Nome della formulazione	Concentrazione target (mg/ml)	Contenitore	Tampone	Eccipienti target	Polisorbato 20	pH finale
1	150	Fiala di vetro da 5 cc.	Acetato di Na 10 mM	Saccarosio 9,0%	0,010%	5,2
2	150	Siringa di vetro BD	Acetato di Na 10 mM	Saccarosio 9,0%	0,010%	5,2
3	150	Siringa di vetro BD	Acetato di Na 10 mM	Metionina 150 mM, Saccarosio 3%	0,010%	5,2
4	150	Siringa di vetro BD	Acetato di Na 10 mM	Prolina 250 mM	0,010%	5,2
5	150	Siringa di plastica CZ	Acetato di Na 10 mM	Saccarosio 9,0%	0,010%	5,2
6	150	Siringa di plastica CZ	Acetato di Na 10 mM	Metionina 150 mM, Saccarosio 3%	0,010%	5,2

7	150	Siringa di plastica CZ	Acetato di Na 10 mM	Prolina 250 mM	0,010%	5,2

La % di specie HMW è stata valutata mediante HPLC a esclusione dimensionale dopo stoccaggio a -30°C e 4°C ai punti temporali indicati in Tabella 32B qui più avanti riportata. In breve, HPLC a esclusione dimensionale separa le proteine sulla base di differenze dei loro volumi idrodinamici. Molecole con volumi di proteine idrodinamici più grandi eluiscono prima di molecole con volumi più piccoli. SEC-HPLC nativa è stata effettuata, utilizzando una colonna 7,8 mm x 300 mm TSK-GEL G3000SWXL (Tosoh Bioscience) con dimensione particellare di 5 µm su una HPLC Agilent con un rivelatore di lunghezze d'onda variabili. La fase mobile era fosfato di sodio 100 mM, cloruro di sodio 250 mM, pH 6,8 +/- 0,1. La portata era di 0,5 ml/minuto. L'eluato di colonna è stato monitorato a 280 nm. Aree di picco integrate nei cromatogrammi sono state utilizzate per quantificare le quantità di specie monomeriche e ad alto peso molecolare.

TABLE 32 B

% di HMW a -30°C			% di HMW a 4°C			
Formulazioni	T = 0	T = 4M	T = 0	T = 2M	T = 4M	T = 6M
1_	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05
2_	0,05	0,05	0,05	0,06	0,04	0,02
3_	0,07	0,26	0,07	0,07	0,07	0,06
4_	0,06	0,07	0,06	0,07	0,06	0,08
5_	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,06
6_	0,06	0,32	0,06	0,06	0,06	0,06
7_	0,08	0,07	0,08	0,06	0,07	0,08

Tabella 32B mostra i risultati di un'analisi SEC-HPLC nativa di formulazioni di 32A elencate in Tabella 30 lasciate incubare a 4°C o -30°C per 0 settimane, 2 mesi, 4 mesi o 6 mesi. "% di HMW" riflette la quantità di 11F1 ad alto peso molecolare in un campione. Questi risultati indicano che non si osservava alcuna questione di formulazione sino a 6 mesi, tuttavia, alcune specie ad alto peso molecolare di fatto aumentavano nelle formulazioni di metionina stoccate a -30°C (ossia, le formulazioni 3 e 6).

La stabilità di formulazioni aggiuntive di 11F1 ad alta concentrazione è stata valutata,

preparando le formulazioni nei contenitori primari, come indicato in Tabella 32C qui di seguito riportata:

Tabella 32 C

Formulazione	Conc. di 11F1 (mg/ml)	Contenitore primario	Eccipienti	Polisorbato 00,010%	Tampone	pH finale
10	150	Fiale di vetro	Saccarosio 9,0%	PS 20	Acetato di Na 10 mM	5,2
20	150	Fiale di vetro	Saccarosio 9,0%	PS 80	Acetato di Na 10 mM	5,2
30	180	Siringa di vetro BD	Metionina 150 mM, saccarosio 3%	PS 20	Acetato di Na 10 mM	5,2
40	180	Siringa di vetro BD	MET 150 mM, saccarosio 3%	PS 80	Acetato di Na 10 mM	5,2
50	180	Siringa di vetro BD	Prolina 250 mM	PS 20	Acetato di Na 10 mM	5,2
60	180	Siringa di vetro BD	Prolina 250 mM	PS 80	Acetato di Na 10 mM	5,2
70	180	Siringa di plastica CZ	Metionina 150 mM, saccarosio 3%	PS 20	Acetato di Na 10 mM	5,2
80	180	Siringa di plastica CZ	Metionina 150 mM, saccarosio 3%	PS 80	Acetato di Na 10 mM	5,2
90	180	Siringa di plastica CZ	Prolina 250 mM	PS 20	Acetato di Na 10 mM	5,2



100	180	Siringa di plastica CZ	Prolina 250 mM	PS 80	Acetato di Na 10 mM	5,2

Le formulazioni sono state incubate a 4° Celsius per un anno. Ai punti temporali indicati in Tabella 32D qui di seguito riportata, un campione è stato rimosso da ciascun contenitore e analizzato tramite SEC-HPLC, come descritto per la Tabella 32B sopra riportata.

Tabella 32D:

% di HMW analizzata tramite esclusione dimensionale si forma dopo stoccaggio di 1 anno a 4°C

% di HMW a 4°C								
Formulazioni	T = 0	T = 2 settimane	T = 4 settimane	T = 6 settimane	T = 6 mesi	T = 6,5 mesi	T = 1 anno	% di cambiamento
10	0,04	0,07	0,08	0,06	0,07	N/A	0,07	0,03
20	0,05	0,07	0,07	0,07	0,06	N/A	0,06	0,01
30	0,08	0,14	N/A	N/A	N/A	N/A	0,05	0,03
40	0,09	0,15	0	N/A	N/A	N/A	0,06	0,03
50	0,08	0,15	0	0	N/A	N/A	0,07	-0,01
60	0,07	0,16	0	0	N/A	N/A	0,08	0,01
70	0,08	0,14	0	0	N/A	0,09	0,06	-0,02
80	0,07	0,14	0	0	N/A	N/A	0,07	0,00
90	0,09	0,15	0	0	N/A	0,09	0,05	-0,04
100	0,08	0,15	0	0	N/A	N/A	0,08	0,00

Ai punti temporali indicati in Tabella 32E qui più avanti riportata, un campione è stato rimosso da ciascun contenitore analizzato tramite HPLC a scambio ionico (CEX-HPLC). HPLC a scambio ionico separa proteine sulla base di differenze della loro carica di superficie. A un pH impostato, le isoforme cariche di 11F1 sono separate su una colonna a scambio cationico ed eluite, utilizzando un gradiente di sale. L'eluente è monitorato tramite assorbanza UV. La distribuzione delle isoforme cariche è valutata, determinando l'area di picco di ciascuna isoforma quale percentuale dell'area totale di picco.

CEX-HPLC nativa è stata effettuata, utilizzando una colonna 4,0 mm diametro interno x 250



mm (Tosoh Bioscience) con dimensione particellare di 10 μ m, su una HPLC Agilent con un rilevatore di lunghezza d'onda variabile. La fase mobile era un gradiente lineare di MES 20 mM, pH 6,0 +/- 0,1 e il medesimo tampone con cloruro di sodio 500 mM. La portata era di 0,6 ml/minuto. L'eluato di colonna è stato monitorato a 280 nm. Le aree di picco integrate nei cromatogrammi sono state utilizzate per quantificare le quantità di isoforme differientemente cariche.

Tabella 32E

% di picco della isoforma principale alla HPLC a scambio cationico dopo stoccaggio di 1 anno a 4°C

% di picco della isoforma principale a 4°C						
Formulazione	T=0	2W	4W	6W	1Y	% di cambiamento
10	76,0	75,9	75,7	75,6	76,2	0,3
20	76,0	76,4	75,7	75,6	76,4	0,5
30	76,0	N/A	N/A	N/A	76,3	0,4
40	75,8	N/A	N/A	N/A	76,0	0,2
50	76,0	N/A	N/A	N/A	76,3	0,4
60	75,8	N/A	N/A	N/A	75,8	0,1
70	75,9	N/A	N/A	N/A	76,2	0,5
80	76,1	N/A	N/A	N/A	76,3	0,3
90	76,0	N/A	N/A	N/A	76,0	0,0
100	75,8	N/A	N/A	N/A	75,9	0,0

Entrambe le Tabelle 32D e 32E dimostrano che le formulazioni di 11F1 descritte esibivano un incremento inferiore al 5% in percentuale di HMW (SEC-HPLC) o una variazione inferiore al 3-5% del picco di isoforma principale (HPLC cationica) a stoccaggio sino a 1 anno a 4°C. Di fatto, cambiamenti di entrambi i parametri erano molto bassi, il che è indicativo di formulazioni altamente stabili.

Rilevamento di particelle subvisibili mediante oscuramento della luce (HIAC):

Un sistema di conteggio delle particelle di origine liquida elettronico (HIAC/Royco 9703 o equivalente), contenente un sensore di oscuramento della luce (HIAC/Royco HRLD-150 o equivalente) con un campionatore di liquidi, quantifica numero di particelle e il loro intervallo dimensionale in un dato campione in esame. Quando le particelle in un liquido passano fra la sorgente luminosa e il rilevatore, esse riducono od "oscurano" il fascio di luce



che cade sul rilevatore. Quando la concentrazione di particelle ricade all'interno dell'intervallo normale del sensore, queste particelle sono rilevate una ad una. Il passaggio di ciascuna particella attraverso la zona di rilevamento riduce la luce incidente sul fotorilevatore e la tensione in uscita del fotorilevatore è momentaneamente ridotta. I cambiamenti di tensione si registrano come impulsi elettrici che sono convertiti dallo strumento nel numero di particelle presenti. Il metodo è aspecifico e misura le particelle indipendentemente dalla loro origine. Le dimensioni particellari che sono state monitorate erano di 10 μm e 25 μm .

In questo Esempio, l'analisi HIAC è stata effettuata, utilizzando campioni che erano stati stoccati a 4°C. Specificamente, i campioni di formulazioni di 11F1 in Tabella 32A erano sottoposti a vuoto (anche chiamato "degassaggio") al fine di rimuovere bolle d'aria che avrebbero potuto essere rilevate come particelle nel sistema di conteggio delle particelle. Per i campioni di 11F1, il metodo era di sottoporre i campioni a vuoto a 75 Torr per un tempo da 1 a 2 ore. Il conteggio delle particelle è stato effettuato entro 2 ore dal completamento del processo di degassaggio.

Figure 30A e 30B mostrano i risultati dei saggi HIAC per le formulazioni sopra identificate, lasciate incubare in contenitori per 0 settimane e quattro mesi. Sono state contate particelle di 10 μm e 25 μm . Le Figure 30A e 30B dimostrano che tutte le formulazioni di 11F1 erano stabili, come misurato con HIAC. Le conte di particelle per tutte le formulazioni sono al di sotto dei limiti USP per ciascuna dimensione particellare (10 μm e 25 μm). Il limite USP per particelle di 10 μm è 6000 per contenitore e per particelle da 25 μm è di 600 per contenitore.

ESEMPIO 33

Specificità di legame di 11F1

I risultati da questo saggio dimostrano che 11F1 si lega a PCSK9 e non a PCSK1, PCSK2, PCSK7 o furina, a dimostrazione della specificità di 11F1 per PCSK9.

PCSK9 biotinilata, diluita in tampone A (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, BSA 0,1%, Tween 0,05%, pH 7,5) è stata legata a piastre da 96 pozzetti rivestite con neutravidina a una concentrazione di 0,2 $\mu\text{g/ml}$ per l'incubazione di un'ora a temperatura ambiente. Separatamente, 0,4 $\mu\text{g/ml}$ di 11F1 sono stati lasciati in incubazione per un'ora a temperatura ambiente con varie concentrazioni (varianti da 0 a 20 $\mu\text{g/ml}$) di PCSK1, PCSK2, PCSK7, PCSK9 o furina (R&D Systems, Minneapolis, MN) (diluita in tampone A senza Tween). Inibitore di furina, a 4,5 $\mu\text{g/ml}$, è stato incluso con tutte le reazioni contenenti furina. La piastra con streptavidina rivestita da PCSK9 è stata lavata con tampone A e la miscela di anticorpo/proteina convertasi è stata aggiunta alla piastra e incubata a temperatura

ambiente per un'ora. Dopo lavaggio, l'anticorpo legato è stato rilevato tramite incubazione con Fc- α -umano di capra-HRP (160 ng/ml, diluito in tampone A) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME), seguito da substrato TMB. La reazione è stata fermata con HCl 1 N e la assorbanza è stata letta a una lunghezza d'onda di 450 nm su uno spettrofotometro Plus 384 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA).

Questo saggio si basava sulla capacità della proproteina convertasi in soluzione di competere per il legame di 11F1 alla PCSK9 catturata dalla piastra. La pre-incubazione di 11F1 e PCSK9 in soluzione riduceva in maniera dose-dipendente e in maniera robusta la quantità di 11F1 che si legava a PCSK9 catturata dalla piastra, rilevata come OD450 ridotta (FIG. 31). Tutti i risultati erano espressi come valore medio di OD450 $\pm$ deviazione standard vs concentrazione della proproteina convertasi. Una pre-incubazione di 11F1 con PCSK1, PCSK2, PCSK7 o furina, in soluzione, non interessava significativamente il legame di 11F1 alla PCSK9 catturata dalla piastra. Pertanto, alle concentrazioni di proteina studiate, 11F1 si lega soltanto a PCSK9 e non agli altri membri della famiglia delle proproteine convertasi esaminati.

ESEMPIO 33

Efficacia dell'inibizione del legame LDLR:PCSK9 da parte di 11F1

L'Esempio dimostra che concentrazioni nanomolari di 11F1 possono inibire il legame di entrambe D374Y e pCSK9 di tipo selvatico al LDLR nelle condizioni di questo saggio.

In breve, piastre trasparenti da 384 pozzetti sono state rivestite con 2 μ g/ml di anticorpo anti-recettore delle LDL di capra (R&D Systems, Minneapolis, MN), diluito in PBS, mediante incubazione per l'intera notte a 4°C. Le piastre sono state lavate accuratamente con tampone A (cacodilato di sodio 100 mM pH 7,5) e poi bloccate con tampone B (1% di latte scremato liofilizzato [Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA] in tampone A) per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo lavaggio, le piastre sono state lasciate incubare con 0,4 μ g/ml di recettore per le LDL (R&D Systems) diluito in tampone C (tampone B integrato con CaCl₂ 10 mM) per 1,5 ore a temperatura ambiente. In concomitanza con questa incubazione, 20 ng/ml di PCSK9 D374Y biotinilata o 100 ng/ml di PCSK9 WT biotinilata erano lasciati incubare con varie concentrazioni di anticorpo anti-PCSK9 11F1 diluito in tampone A (concentrazioni finali che variavano da 6,0 ng/ml a 200 μ g/ml per il saggio con PCSK9 D374Y o da 3,1 ng/ml a 25 μ g/ml per il saggio con PCSK9 WT). Le piastre rivestite da LDLR sono state lavate ed è stata aggiunta la miscela di PCSK9 biotinilata/anticorpo. La piastra con LDLR è stata lasciata incubare a temperatura ambiente per 1 ora. Il legame di PCSK9 biotinilato a LDLR è stato rilevato mediante incubazione con streptavidina-HRP (500 ng/ml in tampone

C), seguito da substrato TMB. La reazione è stata fermata con HCl 1 N e la assorbanza è stata letta a una lunghezza d'onda di 450 nm su uno spettrofotometro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA). Il software GraphPad Prism (v 4.01) è stato utilizzato per rappresentare graficamente il log della concentrazione di anticorpo vs OD450 per determinare i valori di IC50 tramite regressione non lineare.

11F1 inibiva il legame LDLR:PCSK9. I valori di IC50 per 11F1 nel saggio di PCSK9 D374Y variavano da 7,3 nM a 10,1 nM con una media ($\pm$ SD) di $9,1 \text{ nM} \pm 1,5 \text{ nM}$ ($n = 3$). I valori di IC50 per 11F1 nel saggio di PCSK9 di tipo selvatico variavano da 4,4 nM a 8,1 nM con una media ($\pm$ SD) di $5,9 \text{ nM} \pm 1,9 \text{ nM}$ ($n = 3$). Va fatto notare che questi valori dipendono dalla quantità di PCSK9 D374Y ricombinante o PCSK9 WT utilizzata nel saggio di legame. Una curva dose-risposta rappresentativa per entrambi i saggi di D374Y e di tipo selvatico è presentata in Figura 32 e Figura 33, rispettivamente.

ESEMPIO 34

Efficacia di 11F1 nel bloccare la captazione cellulare di LDL

11F1 blocca l'interazione fra PCSK9 e LDLR in vitro e può prevenire la riduzione mediata da PCSK9 della captazione di LDL in cellule HepG2.

In breve, cellule HepG2 umane sono state seminate in piastre da 96 pozzetti nere, a fondo trasparente (Fisher Scientific CO LLC, Santa Clara, CA) a una densità di 5×10^4 cellule per pozzetto in DMEM (Mediatech Inc., Herndon, VA) integrato con FBS 10% e 1% di soluzione di antibiotico-antimicotico (Mediatech Inc., Herndon, VA). Le cellule sono state incubate a 37 °C (CO2 5%) per l'intera notte. Per formare il complesso fra PCSK9 D374Y e anticorpo o PCSK9 WT e anticorpo, sono state preparate diluizioni seriali (1:2) di 11F1, da 666,7 nM a 0,7 nM (per bloccare PCSK9 D374Y) o da 3,3 μM a 3,3 nM (per bloccare PCSK9 WT), in tampone di formulazione (HEPES 25 mM, pH 7,5, NaCl 0,15 M). PCSK9 D374Y (2 $\mu\text{g/ml}$) o PCSK9 WT (25 $\mu\text{g/ml}$) sono state diluite in tampone di captazione (DMEM contenente FBS 1%) e lasciate incubare con le varie concentrazioni di 11F1 o tampone di captazione da solo (controllo negativo) per 1 ora a temperatura ambiente sotto scuotimento. BODIPY-LDL (Invitrogen, Carlsbad, CA) è stato diluito in tampone di captazione sino a una concentrazione di 12 $\mu\text{g/ml}$. In seguito a incubazione per l'intera notte, le cellule HepG2 sono state risciacquate due volte con DPBS (Mediatech Inc., Herndon, VA). Venticinque microlitri del complesso PCSK9 D374Y o PCSK9 WT con 11F1 e 25 μl di BODIPY-LDL diluito (Invitrogen, Carlsbad, CA) venivano aggiunti alle cellule e si lasciano incubare a 37°C (CO2 5%) per 3 ore. Le cellule erano lavate con DPBS 5 volte e risospese in 100 μl di DPBS. Segnali di fluorescenza erano rilevati, utilizzando un lettore di

piastre Safire (Tecan Systems Inc., San Jose, CA) a 480-520 nm (eccitazione) e 520-600 nm (emissione) ed espressi come unità di fluorescenza relativa (RFU).

Si utilizzava un software GraphPad Prism (Versione 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, CA) per rappresentare graficamente il log della concentrazione anticorpale vs RFU e determinare i valori di EC50 mediante regressione non lineare, utilizzando il programma di adattamento della curva (pendenza variabile) dose-risposta sigmoidale.

Questo Esempio mostra che 11F1 bloccava la diminuzione mediata da PCSK9 D374Y o da PCSK9 della captazione delle LDL in cellule HepG2 in maniera dose-dipendente. L'aggiunta di PCSK9 D374Y (2 µg/ml) o PCSK9 WT (25 µg/ml) ricombinante, purificata a cellule HepG2 riduceva la captazione di BODIPY-LDL di una percentuale da -50 a 60% e -40% del livello misurato in cellule non trattate, rispettivamente. Gli anticorpi riportavano in maniera dose-dipendente la captazione di LDL al livello osservato in cellule non trattate. Il valore di EC50 medio ($\pm$ SD) per la capacità di 11F1 di bloccare la diminuzione mediata da PCSK9 D374Y della captazione di LDL era $35,3 \pm 9,1$ nM ($n = 6$, Figura 34). Il valore di EC50 medio per la capacità di 11F1 di bloccare la diminuzione mediata da PCSK9 WT della captazione di LDL era $124,2 \pm 28,5$ nM ($n = 3$, Figura 35). Va fatto notare che questi valori di EC50 sono in funzione della quantità di PCSK9 D374Y ricombinante o PCSK9 WT utilizzata nel saggio cellulare. Il valore di EC50 è minore rispetto a PCSK9 D374Y di PCSK9 WT poiché nel saggio è stata utilizzata meno PCSK9 D374Y, dal momento che la sua affinità di legame per il LDLR è da 5 a 30 volte maggiore di quella di PCSK9 WT (Cunningham et al, 2007; Fisher et al, 2007; Kwon et al, 2008).

I valori di EC50 qui riportati sono rappresentativi di valori medi derivati da misurazioni separate di 11F1 in un numero da 3 a 6.

ESEMPIO 35

Efficacia di 11F1 e 8A3 nel bloccare PCSK9 espressa tramite un virus Adeno-associato in un modello di topo

Una singola somministrazione endovenosa in bolo degli anticorpi anti-PCSK9 11F1 o 8A3 porta a una diminuzione significativa di C-non HDL e TC sierici in topi esprimanti PCSK9 umana mediante AAV. Questo Esempio dimostra l'efficacia di entrambi gli anticorpi anti-PCSK9 nel bloccare la funzione di PCSK9 umana in vivo.

In breve, 120 topi C57BL/6 esprimanti PCSK9 umana sono stati generati mediante infezione con un virus adeno-associato (AVV) ingegnerizzato codificante per la PCSK9 umana, da cui risultano livelli elevati di colesterolo contenuto nelle lipoproteine a bassa densità circolanti (LDL-C). Un'analisi del colesterolo sierico è stata effettuata, utilizzando l'analizzatore per

la chimica Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics Inc, Indianapolis, IN). Gli animali sono stati randomizzati in gruppi di trattamento con livelli simili di C-non HDL (C-LD e C-VLDL), C-HDL e TC. Il giorno di trattamento 0 (T = 0) un sottogruppo di topi è stato sacrificato mediante eutanasia e il siero è stato raccolto per stabilire i livelli di linea basale di quel giorno. Ai topi rimanenti era poi somministrato 11F1, 8A3 o anticorpo di controllo IgG2 anti-emocianina della Megathura crenulata (KLH) 30 mg/kg. tramite iniezione nella vena della coda. I giorni da 1 a 5 seguenti l'iniezione, sottogruppi di topi sono stati sacrificati per eutanasia e sangue intero è stato raccolto dalla vena cava e lasciato coagulare per 30 minuti a temperatura ambiente. In seguito a centrifugazione a 12000 rpm con una centrifuga da piano di lavoro per 10 minuti, è stato raccolto il siero. Un'analisi del colesterolo sierico è stata effettuata, utilizzando l'analizzatore per la chimica Cobas Integra 400 plus.

Le concentrazioni sieriche di PCSK9 sono state determinate, utilizzando un saggio ELISA sandwich. Le piastre trasparenti da 96 pozzetti sono state rivestite per l'intera notte con 2 µg/ml di anticorpo anti-PCSK9 monoclonale (31H4) diluito in 1X PBS. Le piastre sono state lavate abbondantemente con 1X PBS/Tween ,05% e poi bloccate per 2 ore con BSA/1X PBS 3%. Dopo lavaggio, le piastre sono state incubate per 2 ore con siero diluito in diluenti di saggio generici (Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN). PCSK9 umana ricombinante (da 1 ng/ml a 500 ng/ml) è stata saggiata contemporaneamente e utilizzata per generare una curva standard su ciascuna piastra ELISA. Un anticorpo anti-PCSK9 biotinilato policlonale di coniglio (D8773, Amgen Inc, CA) è stato aggiunto 1 µg/ml (in BSA 1%/PBS), seguito da neutravidina-HRP 200 ng/ml (in BSA 1%/PBS). PCSK9 legata è stata rilevata mediante incubazione con substrato TMB. La reazione è stata fermata con aggiunta di HCl 1 N e la assorbanza misurata a 450 nm su uno spettrofotometro Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA). La curva standard (adattamento logistico a 4 parametri) generata con PCSK9 umana ricombinante è stata utilizzata per determinare la concentrazione corrispondente di PCSK9 nei campioni di siero.

Le concentrazioni sieriche di anticorpo sono state determinate, utilizzando un saggio ELISA sandwich. IgG policlonale anti-Fc umano di capra e un reagente policlonale anti-Fcγ di IgG umano di capra HRP-marcato (entrambi di Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA) sono stati utilizzati come anticorpo di cattura anticorpo di rilevamento, rispettivamente. Una soluzione di substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), fatta reagire con perossido e in presenza di perossidasi di radice di rafano (HRP), creava un segnale colorimetrico che era proporzionale alla quantità del rispettivo anticorpo anti-PCSK9 legato dal reagente di cattura. L'intensità del colore (densità ottica, OD) è stata misurata a 450 nm

meno 650 nm, utilizzando un lettore di micropiastre (Spectra Max Plus 384). I dati sono stati analizzati, utilizzando il pacchetto di riduzione dei dati Watson versione 7.0.0.01 (Thermo Scientific, Waltham, MA) con una regressione logistica (auto-stima) di curve standard a preparate separatamente. Il limite inferiore della quantificazione (LLOQ) per il saggio era ng/ml. 34,4.

Calcolo di parametri farmacocinetici in topi con AAV

Un'analisi non compartimentale (NCA) è stata effettuata sulle concentrazioni sieriche, utilizzando i punti temporali nominali prestabiliti per ciascun soggetto con l'uso di WinNonlin Enterprise, versione 5.1.1 (Pharsight, St. Louis, MO). I punti dati per la stima delle costanti di velocità di eliminazione terminale e l'emivita sono stati scelti mediante ispezione visiva dei profili di concentrazione-tempo. Parametri NCA riportati includono: emivita ($t_{1/2}$) apparente, area sotto la curva di concentrazione sierica-tempo dal tempo zero all'ultima concentrazione misurata (AUC_{0-t}) e clearance sierica apparente (CL_{0-t}). AUC_{0-t} è stata determinata, utilizzando il metodo trapezoidale lineare log-lineare e CL_{0-t} è stata calcolata tramite dose/AUC_{0-t}. Per gli anticorpi 11F1, 8A3 e 31H4. Un'analisi in soluzione della dose post-studio mostrava che le dosi effettive erano entro il 20% di 30 mg/kg target. Tuttavia, per il controllo dato dalle IgG2, l'analisi mostrava che la dose effettiva era soltanto il 40% del target inteso. Pertanto, una dose corretta di 12 mg/kg è stata utilizzata per il calcolo di CL_{0-t} per il controllo IgG2. I parametri sono stati riportati in tre figure significative, ad eccezione dell'emivita che era riportata in due figure significative.

Analisi statistica

Tutti i risultati relativi al colesterolo sono stati espressi quale media $\pm$ errore standard della media. Tutti i dati farmacocinetici sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard. Il valore p di 0,05, determinato tramite ANOVA a 1 criterio, è stato utilizzato quale soglia per determinare la significanza statistica fra animali in cui era stato iniettato anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH e quelli trattati con dosi di anticorpo anti-PCSK9 nello stesso punto temporale.

Effetto di anticorpi anti-PCSK9 su C-non HDL, C-HDL e TC sierici

Per stabilire una linea basale, un sottogruppo di topi esprimenti PCSK9 umana è stato sacrificato tramite eutanasia prima dell'iniezione di anticorpi e il sangue è stato raccolto. Livelli di C-non HDL, C-HDL e TC in questi animali erano 33 ± 4 , 117 ± 4 e 183 ± 9 mg/dL, rispettivamente (media $\pm$ SEM). I livelli di PCSK9 in animali naive, come determinato, erano $4921 \text{ ng/ml} \pm 2044 \text{ ng/ml}$.

A confronto con topi a cui era stato iniettato anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH (animali

di controllo), l'iniezione di 11F1 produceva un abbassamento significativo del C-non HDL nei giorni 1, 2 e 4 post-iniezione (con un massimo di 59%), mentre TC era significativamente ridotto soltanto il giorno 4 (del 22%) (Figura 36, Figura 37). Nessuna riduzione significativa di C-HDL si osservava in qualsiasi punto temporale (Figura 38).

A confronto con animali di controllo, l'iniezione di 8A3 produceva una significativa riduzione del C-non HDL nei giorni 1, 2 e 4 post-iniezione (con un massimo di 65%), mentre TC era significativamente ridotto soltanto il giorno 2 post-iniezione (con un massimo del 24%) (Figura 36, Figura 37). Nessuna riduzione significativa di C-HDL si osservava in qualsiasi punto temporale (Figura 38).

Farmacocinetica

A una dose endovenosa di 30 mg/kg, 11F1 e 8A3 avevano un comportamento farmacocinetico molto simile (FIG. 39). Per queste due molecole, le esposizioni AUC_{0-t}, CL_{0-t} stimato ed emivite apparenti erano equivalenti (Tabella di FIG. 40). L'anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH aveva una esposizione AUC_{0-t} inaspettatamente inferiore a 11F1 e 8A3, ma questo era verosimilmente dovuto al fatto che l'anticorpo fosse somministrato a una dose inferiore a quella intesa (12 mg/kg anziché 30 mg/kg; l'analisi della soluzione della dose mostrava che la concentrazione di anticorpo era il 40% del target). CL_{0-t} dell'anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH era simile a quello di 11F1 e 8A3, quando calcolato, utilizzando la dose corretta e l'emivita apparente dell'anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH era stimata > 120 ore. Questi dati suggerivano che gli effetti del ligando di PCSK9 sulla disposizione anticorpale fossero meno pronunciati per 11F1 e 8A3, quando confrontati con altri anticorpi dosati nel modello AAV, poiché i valori di CL_{0-t} di 11F1 e 8A3 sono più simili all'anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH.

Sommario.

L'espressione di PCSK9 da parte di AAV nei topi (approssimativamente 5 µg/ml) risultava in un livello sierico di C-non HDL di approssimativamente 33 mg/dl. In seguito a iniezione 30 mg/kg di 11F1, si osservava una significativa riduzione sierica di C-non HDL nei giorni 1, 2 e 4 post-iniezione (con un massimo di 59% a confronto con animali di controllo). Una riduzione significativa del TC è stata osservata soltanto nel giorno 4. L'iniezione di 8A3 risultava in un modello simile di riduzione del C-non HDL con un massimo del 65% a confronto con animali di controllo. Tuttavia, la somministrazione di 8A3 risultava in una riduzione significativa del TC il giorno 2 soltanto, post-iniezione, con un massimo di 24%. Nessuna significativa riduzione del C-HDL si osservava in animali a cui era somministrato 11F1 o 8A3. L'analisi dei livelli sierici anticorpali di 11F1 e 8A3 dimostrava un profilo

simile a quello dell'anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH.

ESEMPIO 36

Effetto di una singola dose sottocute di 11F1, 21B12 e 8A3 su lipidi sierici in scimmie cinomolghe.

Una singola somministrazione SC di 11F1, 8A3 o 21B12 a scimmie cinomolghe porta a una significativa riduzione di C-LDL e TC sierici. Questo studio dimostrava la capacità di anticorpi anti-PCSK9 di abbassare il colesterolo sierico in primati non umani.

In breve, scimmie cinomolghe maschio naive sono state lasciate acclimatarsi al loro ambiente per almeno 2 settimane prima della sperimentazione. Gli animali sono stati randomizzati in gruppi di trattamento sulla base di un pre-screening dei loro livelli sierici di TC, C-HDL, C-LDL e trigliceridi e del loro peso corporeo. Dopo 1 settimana, gli animali sono stati mantenuti a digiuno per l'intera notte e prelievi di sangue sono stati effettuati dai vasi periferici (vena cefalica o safena) per la misurazione dei livelli sierici dei lipidi in un punto temporale designato T = 0. Agli animali è stato poi iniettato SC anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH, 11F1, 21B12 o 8A3 (tutti in NaOAc 10 mM pH 5,2, saccarosio 9%) 0,5 mg/kg (tutti 0,4 ml/kg di peso corporeo). Campioni di sangue a digiuno sono stati poi raccolti da animali in punti temporali designati su un periodo di 45 giorni.

Progetto sperimentale

Gruppo No	N. maschi	Via	Trattamento	Livello di dose (mg/kg)	Conc (mg/ml)	Volume (ml/kg)
1	5	SC	Anti-KLH	0,5	1,09	0,4
2	5	SC	21B12	0,5	1,19	0,4
3	5	SC	11F1	0,5	1,11	0,4
4	5	SC	8A3	0,5	1,25	0,4

In punti temporali specificati, è stato prelevato sangue dagli animali in condizioni di digiuno notturno dai vasi periferici (vena cefalica o safena). Sangue intero è stato lasciato coagulare per 30 minuti a temperatura ambiente. In seguito a centrifugazione a 3000 rpm per 20 minuti, è stato raccolto il siero. Un'analisi diretta del colesterolo sierico è stata effettuata, utilizzando l'analizzatore Cobas Integra 400 (Roche Diagnostics Inc, Indianapolis, IN). Livelli sierici di apolipoproteina B sono stati determinati in punti temporali specificati (giorno 0, 3, 6, 15, 24 e 33) mediante Anilytics, MD, con la seguente metodologia. Un'aliquota di 17 µl di campione (nessuna preparazione) è stata utilizzata per l'analisi con un analizzatore Hitachi

717 che utilizza una curva standard a 6 punti. Se il valore iniziale del campione era maggiore della linearità della curva standard, il campione era diluito e ripetuto con il risultato moltiplicato per l'appropriato fattore di diluizione. I reagenti per il saggio (Kit di reagenti per APO-B No. 86071, serie di anticorpi No. 86060, serie di controllo No. 86103) sono stati ottenuti da DiaSorin (Stillwater, MN).

Le concentrazioni anticorpali nel siero sono state determinate, utilizzando un saggio immuno-assorbente legato a enzima (ELISA) con un intervallo di saggio da 34,4 a 3000 ng/ml (laddove 34,4 ng/ml è il limite inferiore di quantificazione [LLOQ]).

Un'analisi non compartimentale (NCA) è stata effettuata sulle concentrazioni sieriche, utilizzando i punti temporali nominali prestabiliti per ciascun soggetto con l'uso di Watson® LIMS, versione 7.0.0.01 (Thermo Scientific, Waltham, MA). I punti dati per stimare le costanti di velocità di eliminazione terminale e l'emivita, sono stati scelti mediante ispezione visiva del profilo di concentrazione-tempo e miglior adattamento lineare (tipicamente da 360 h sino a che le concentrazioni anticorpali non cadano al di sotto del limite inferiore di quantificazione). Parametri NCA riportati includono: emivita terminale ($t_{1/2,z}$), massima concentrazione sierica (C_{max}), area sotto la curva concentrazione sierica-tempo da tempo zero a infinito (AUC_{0-inf}) e clearance sierica apparente (CL/F). AUC_{0-inf} è stata calcolata, utilizzando il metodo lineare log-lineare trapezoidale. Tutti i parametri sono stati riportati in tre figure significative, ad eccezione dell'emivita che era riportata in due figure significative.

Analisi statistica

Un modello statistico che considera la linea basale quale covariata e il gruppo di trattamento come effetto fisso è stato adattato alla risposta trasformata da logaritmo per ciascun punto temporale per C-LDL, C-HDL, TC e trigliceridi. La correzione con confronti multipli di Tukey è stata applicata per regolare i confronti a coppie in ciascun punto temporale. Significanza statistica è stata valutata per $\alpha = 0,05$, utilizzando valori p regolati.

Effetto di 11F1, 21B12 e 8A3 sul colesterolo LDL sierico

Un abbassamento massimale di C-LDL per 11F1 è stato osservato 9 giorni dopo l'iniezione con un abbassamento del 57% di C-LDL a confronto con scimmie trattate con anticorpo di controllo IgG 2 anti-KLH (animali di controllo). Il C-LDL tornava a livelli simili a quelli osservati in animali di controllo per il giorno 27. Un abbassamento massimale di C-LDL per 21B12 è stato osservato 3 giorni dopo l'iniezione con un abbassamento del 64% di C-LDL a confronto con animali di controllo. C-LDL ritornava a livelli simili a quelli di animali di controllo per il giorno 6. Un abbassamento massimale di C-LDL per 8A3 è stato osservato 4 giorni dopo l'iniezione con un abbassamento del 54% di C-LDL a confronto con animali



di controllo. C-LDL ritornava a livelli simili a quelli osservati in animali di controllo per il giorno 27 (FIG. 41).

Effetto di 11F1, 21B12 e 8A3 su colesterolo totale sierico

Un abbassamento massimale di TC per 11F1 è stato osservato 9 giorni dopo l'iniezione con un abbassamento del 27% di TC a confronto con scimmie trattate con anticorpo di controllo IgG 2 anti-KLH (animali di controllo). Il TC tornava a livelli simili a quelli osservati in animali di controllo per il giorno 27. Un abbassamento massimale di TC per 21B12 è stato osservato 3 giorni dopo l'iniezione con un abbassamento del 20% di TC a confronto con animali di controllo. TC ritornava transitoriamente a livelli simili a quelli osservati in scimmie trattate con veicolo per il giorno 4, ma era significativamente più basso fra i giorni 14 e 18, in maniera inclusiva. Un abbassamento massimale di TC per 8A3 è stato osservato 9 giorni dopo l'iniezione con un abbassamento del 22% di TC a confronto con animali di controllo. TC ritornava a livelli simili a quelli osservati in animali di controllo per il giorno 30 (FIG. 42).

Effetto di 11F1, 21B12 e 8A3 su colesterolo HDL e trigliceridi sierici

In media e per ciascun punto temporale, i livelli di C-HDL o trigliceridi per animali trattati con 11F1 o 8A3 non erano significativamente differenti (sulla base di $\alpha = 0,05$ livello di significanza) da quelli osservati in scimmie trattate con anticorpo di controllo IgG 2 anti-KLH. Tuttavia, 21B12 induceva di fatto un cambiamento statisticamente significativo di C-HDL in un singolo punto temporale (giorno 18 dopo l'iniezione) (Figura 43 e Figura 45).

Effetto di 11F1, 21B12 e 8A3 su apolipoproteina B (ApoB)

Livelli sierici di ApoB sono stati misurati nei giorni 3, 6, 15, 24 e 33, post-iniezione. 11F1 e 8A3 sono stati associati a un abbassamento di ApoB nei giorni da 3 a 24, a confronto con scimmie trattate con anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH (Figura 46). 21B12 si associava a più bassi livelli di ApoB statisticamente significativi nel giorno 3 soltanto.

Profili farmacocinetici di 11F1, 21B12 e 8A3

Una rappresentazione grafica riassuntiva dei profili di concentrazione media-tempo per trattamento è mostrata in 748. I parametri farmacocinetici medi stimati per animali riceventi 11F1, 21B12, 8A3 e anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH sono visualizzati in Tabella di Figura 47.

L'assorbimento anticorpale in tutti i gruppi era coerente con e caratteristico di una somministrazione anticorpale sottocutanea. Il comportamento farmacocinetico di 21B12 riguardo a CL/F, C_{max} e AUC_{0-inf} era coerente con quello osservato in studi precedenti, dove 21B12 era somministrato alla stessa dose. La farmacocinetica di 11F1 e 8A3 differiva

significativamente da 21B12, dove si osservavano un CL/F più basso (approssimativamente il 15% di CL/F di 21B12) ed emivite più lunghe (approssimativamente 200 h a confronto con 40 h per 21B12). Degno di nota, le farmacocinetiche di 11F1 e 8A3 erano entrambe indistinguibili fra loro e con quella dell'anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH. Questi dati suggeriscono che la disposizione di 11F1 e 8A3 sia interessata in misura di gran lunga minore dall'associazione con il target PCSK9 rispetto a 21B12, dato che 11F1 e 8A3 hanno lo stesso profilo di esposizione dell'anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH con nessuna affinità per PCSK9.

Sommario dei risultati

Nel corso dello studio di 45 giorni, è stato osservato un abbassamento statisticamente significativo di TC e C-LDL in animali a cui era stato somministrato 11F1, 21B12 o 8A3 a confronto con l'anticorpo di controllo IgG 2 anti-KLH. 11F1 era associato a un abbassamento statisticamente significativo di C-LDL (vs anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH) dal giorno 2 al giorno 24 in maniera inclusiva. 21B12 dimostrava un abbassamento statisticamente significativo di C-LDL (vs anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH) dal giorno 1 al giorno 4 in maniera inclusiva. 8A3 dimostrava un abbassamento statisticamente significativo di C-LDL (vs anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH) dal giorno 1 al giorno 4 in maniera inclusiva. Cambiamenti di TC e ApoB riflettevano cambiamenti osservati nel C-LDL per tutti i gruppi. 11F1 otteneva un abbassamento massimale di C-LDL (vs anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH nello stesso punto temporale) 9 giorni dopo l'iniezione (-57%). 21B12 otteneva un abbassamento massimale di C-LDL (vs anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH nello stesso punto temporale) 3 giorni dopo l'iniezione (-64%). 8A3 otteneva un abbassamento massimale di C-LDL (vs anticorpo di controllo IgG2 anti-KLH nello stesso punto temporale) 4 giorni dopo l'iniezione (-54%). 21B12 abbassava C-HDL in un singolo punto temporale, 18 giorni dopo l'iniezione. Non si osservavano cambiamenti statisticamente significativi dei livelli di HDL-C in seguito a somministrazione di 11F1 o 8A3. Non si osservavano cambiamenti statisticamente significativi dei livelli di trigliceridi in seguito a somministrazione di 11F1, 21B12 o 8A3.

ESEMPIO 37

Studio in due parti per valutare sicurezza, tollerabilità ed efficacia di un anticorpo anti-PCSK9 umano su C-LDL in soggetti con ipercolesterolemia familiare in omozigosi.
Progetto di studio: Questo è uno studio in 2 parti. La parte A è uno studio pilota multicentrico, a braccio singolo, aperto La parte B è uno studio multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato da placebo di un anticorpo umano, 21B12 con arruolamento

espanso, ma peraltro di progetto identico a quello della parte A. Sia i criteri di inclusione/esclusione che lo schema di valutazioni saranno gli stessi per le parti A e B.

I criteri di inclusione includono:

- Maschi e femmine ≥ 12 sino a ≤ 65 anni di età
- Diagnosi di ipercolesterolemia familiare in omozigosi.
- Terapie stabili ipolipemizzanti per almeno 4 settimane
- Colesterolo LDL > 130 mg/dl (3,4 mmol/l)
- Trigliceride < 400 mg/dl (4,5 mmol/l)
- Peso corporeo > 40 kg o superiore al momento dello screening.

I criteri di esclusione includono:

- LDL o plasmaferesi entro 8 settimane prima della randomizzazione
- Classe III o IV secondo la New York Heart Failure Association (NYHA) o l'ultima frazione di eiezione ventricolare sinistra nota $< 30\%$
- Infarto miocardico, angina instabile, intervento coronarico percutaneo (PCI), innesto di bypass nelle arterie coronarie (CABG) o ictus entro 3 mesi dalla randomizzazione
- Intervento di cardiocirurgia o rivascolarizzazione programmato/a
- Aritmia cardiaca non controllata
- Ipertensione non controllata

Lo schema delle valutazioni include, ma non in via limitativa, la raccolta di dati di un evento avverso (AE) e di un evento avverso significativo (SAE), segni vitali, medicinali concomitanti, esami di laboratorio, ecc.

Soggetti che soddisfanno i criteri di inclusione/esclusione saranno istruiti a seguire una dieta TLC (o comparabile) secondo Adult Treatment Panel NCEP e sarà loro richiesto di mantenere la terapia ipolipemizzante corrente nel corso di tutta la durata degli studi.

La formulazione di 21B12 sarà presentata come liquido congelato, incolore, trasparente, sterile. Ciascuna fiala sterile viene riempita con 1 ml di volume rilasciabile di 70 mg/ml di 21B12 formulato con acetato di sodio 10 mM, saccarosio 9% (p/v), polisorbato 20 0,004% (p/v), pH 5,2. Ciascuna fiala è per singolo uso soltanto. Il placebo sarà presentato in contenitori identici come liquido congelato, privo di proteine, incolore, trasparente, sterile ed è formulato come acetato di sodio 10 mM, saccarosio 9% (p/v), polisorbato 0,004% (p/v), pH 5,2.

Nella parte A, 4-16 soggetti saranno arruolati e riceveranno una formulazione open label di 21B12 (420 mg Q4W). Le visite previste dallo studio avranno cadenza ogni 4 settimane. Queste visite comporteranno la raccolta di dati di eventi avversi (AE) e di eventi avversi

significativi (SAE), segni vitali, medicinali concomitanti, esami di laboratorio, ecc. Un pannello di lipidi a digiuno sarà raccolto alla settimana 6 per valutare il livello nadir di C-LDL in risposta al trattamento con la formulazione di 21B12. La formulazione di 21B12 sarà somministrata nel giorno 1, nella settimana 4 e nella settimana 8. La visita di fine studio (EOS) e l'ultima stima dei lipidi avranno luogo durante la settimana 12.

Approssimativamente 51 nuovi soggetti saranno arruolati nella Parte B. I soggetti arruolati saranno randomizzati a una collocazione 2:1 in 2 gruppi di trattamento: 420 mg di 21B12 Q4W SC o placebo Q4W SC. La randomizzazione sarà stratificata mediante livelli di C-LDL di linea basale. Le visite previste dallo studio avranno cadenza ogni 4 settimane, con due visite facoltative che hanno luogo alla settimana 2 e alla settimana 10. Le visite comporteranno la raccolta di dati di AE e SAE, segni vitali, assunzione concomitante di medicinali, esami di laboratorio, ecc. Un pannello di lipidi a digiuno sarà raccolto nella settimana 6 per valutare il livello nadir di C-LDL in risposta al trattamento con la formulazione di 21B12. La formulazione di 21B12 sarà somministrata il giorno 1, la settimana 4 e la settimana 8. La visita di fine studio (EOS) e l'ultima stima dei lipidi avranno luogo nella settimana 12 per tutti i soggetti.

Equivalenti

La descrizione scritta che precede si considera sufficiente a rendere un esperto del ramo in grado di attuare nella pratica l'invenzione. La descrizione e gli Esempi che precedono illustrano nei dettagli talune forme di realizzazione dell'invenzione e descrivono la migliore modalità contemplata dagli inventori. Sarà apprezzato, tuttavia, che non conta come possa apparire dettagliato nel testo quanto qui in precedenza riportato, l'invenzione potrà essere attuata nella pratica in molti modi e l'invenzione deve essere concepita secondo le rivendicazioni allegate e qualsiasi loro equivalente.



RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo monoclonale che si lega specificatamente a PCSK9 comprendente
 - a) una regione determinante complementarietà (CDR) di catena leggera della sequenza CDRL1 in SEQ ID NO:23, una CDRL2 della sequenza CDRL2 in SEQ ID NO:23 e una CDRL3 della sequenza CDRL3 in SEQ ID NO:23; e
una regione determinante complementarietà (CDR) di catena pesante della sequenza CDRH1 in SEQ ID NO:49, una CDRH2 della sequenza CDRH2 in SEQ ID NO:49 e una CDRH3 della sequenza CDRH3 in SEQ ID NO:49;
in cui le CDR sono definite da Cothia o AbM:
 - b) una regione determinante complementarietà (CDR) di catena leggera CDRL1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 158, una CDRL2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 162, una CDRL3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 395; e
una regione determinante complementarietà (CDR) di catena pesante CDRH1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 368, una CDRH2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 175, una CDRH3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 180;
 - c) una regione determinante complementarietà (CDR) di catena leggera CDRL1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 305, una CDRL2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 312, una CDRL3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 319; e
una regione determinante complementarietà (CDR) di catena pesante CDRH1 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 308, una CDRH2 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 320, una CDRH3 comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 310;
- o
- d) una regione variabile di catena leggera che comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 23 e una regione variabile di catena pesante comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:49
per l'uso nel/nella
 - (i) abbassamento del colesterolo LDL sierico in un paziente umano di almeno il 15%; e/o
 - (ii) trattamento o prevenzione di un disturbo correlato al colesterolo in un paziente umano che presenta un livello sierico elevato di colesterolo LDL;



comprendente la somministrazione dell'anticorpo monoclonale al paziente umano che ne necessita a una dose da 70 mg a 450 mg.

2. Anticorpo monoclonale per uso secondo rivendicazione 1(ii), in cui il disturbo correlato al colesterolo è selezionato dal gruppo consistente di ipercolesterolemia familiare, ivi incluse ipercolesterolemia familiare in eterozigosi e ipercolesterolemia familiare in omozigosi, ipercolesterolemia non familiare, lipoproteine (a) elevate, malattia cardiaca, sindrome metabolica, diabete, malattia coronarica, ictus, malattia cardiovascolare, malattia di Alzheimer, malattia arteriosa periferica, iperlipidemia e dislipidemia.
3. Anticorpo monoclonale per uso secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il livello sierico di colesterolo LDL di detto paziente è abbassato di una quantità selezionata dal gruppo consistente di a) almeno il 30%, b) almeno il 40%, c) almeno il 50% e d) almeno il 60%.
4. Anticorpo monoclonale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, in cui l'anticorpo monoclonale è somministrato a un paziente a una dose selezionata dal gruppo consistente di: a) da 70 mg a 450 mg, b) da 140 mg a 200 mg, c) da 140 mg a 180 mg, d) da 140 mg a 170 mg, e) 140 mg, f) 150 mg, g) 420 mg, h) 450 mg.
5. Anticorpo monoclonale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, in cui l'anticorpo monoclonale è somministrato a un paziente secondo un prospetto selezionato dal gruppo consistente di: (1) una volta alla settimana, (2) una volta ogni due settimane, (3) una volta al mese, (4) una volta a mesi alterni, (5) una volta ogni tre mesi (6) una volta ogni sei mesi e (7) una volta ogni dodici mesi.
6. Anticorpo monoclonale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui l'anticorpo monoclonale è somministrato a un paziente secondo un prospetto selezionato dal gruppo consistente di:
 - (a) da 70 mg a 420 mg somministrati una volta ogni 2 settimane (Q2W);
 - (b) da 140 mg a 280 mg somministrati una volta ogni due settimane (Q2W);
 - (c) almeno una quantità di 140 mg ogni due settimane o a settimane alterne (Q2W);
 - (d) da 280 mg a 420 mg somministrati una volta ogni 4 settimane (Q4W); e
 - (e) sino a 420 mg ogni due settimane (Q2W); e
 - (f) almeno una quantità di 420 mg ogni quattro settimane (Q4W).
7. Anticorpo monoclonale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, in cui la fase di somministrazione comprende la somministrazione dell'anticorpo monoclonale per via parenterale, facoltativamente in cui la fase di somministrazione comprende la somministrazione dell'anticorpo monoclonale per via endovenosa o per via sottocutanea.
8. Anticorpo monoclonale per uso secondo la rivendicazione 1, in cui l'anticorpo

monoclonale è somministrato a un paziente:

(a) a una dose da 105 mg a 280 mg per via sottocutanea una volta ogni due settimane, e in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato almeno del 30-50% per 7-14 giorni, facoltativamente in cui la dose è 140 mg; o

(b) a una dose da 280 a 450 mg per via sottocutanea una volta al mese e in cui il livello sierico di colesterolo LDL del paziente è abbassato di almeno il 30-50% per giorni da 21 a 31, facoltativamente in cui la dose è 420 mg.

9. Anticorpo monoclonale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, in cui l'anticorpo monoclonale è somministrato al paziente prima di, dopo o con almeno un altro agente ipocolesterolemizzante.

10. Anticorpo monoclonale per uso secondo la rivendicazione 9, in cui l'altro agente ipocolesterolemizzante è selezionato dal gruppo consistente di: statine, ivi inclusi, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina, acido nicotinico, acido fibrico, sequestranti degli acidi biliari, inibitore dell'assorbimento del colesterolo, agenti modificanti i lipidi, agonisti di PPAR gamma, agonisti di PPAR alfa/gamma, inibitori della squalene sintasi, inibitori di CETP, anti-ipertensivi, agenti anti-diabete, ivi inclusi solfonil uree, insulina, analoghi di GLP-1, inibitori di DDPIV, modulanti di ApoB, inibitori di MTP e/o trattamenti dell'arteriosclerosi obliterante, oncostatina M, estrogeno, berberina e un agente terapeutico per un disturbo correlato all'immunità.



LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLE 2-5/155

Figura 1B (1-4)

“Query Frame *” = “Query Frame *”

TAVOLE 6-7/155

Figura 2A-2B

“LINE” = “LINEA”

“Germline” = “Linea germinale”

TAVOLE 8-9/155

Figura 2C-2D

“LINE” = “LINEA”

TAVOLE 10-11/155

Figura 3A-3B

“LINE” = “LINEA”

“Germline” = “Linea germinale”

TAVOLE 12-13/155

Figura 3C-3D

“LINE” = “LINEA”

TAVOLE 14-15/155

Figura 3E-3F

“Nucleotide sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena pesante:”

“Amino acid sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

“Nucleotide sequence of light chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena leggera:”

“Amino acid sequence of light chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

TAVOLA 16/155

Figura 3G

“Nucleotide sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena pesante:”

“Amino acid sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

“Nucleotide sequence of light chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena leggera:”

“Amino acid sequence of light chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

“Alternative Nucleotide sequence of light chain variable region (26E10v1):” = “Sequenza nucleotidica alternativa di regione variabile di catena leggera (26E10v1):”

TAVOLE 17-30/155

Figura 3H-3U

“Nucleotide sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena pesante:”

“Amino acid sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

“Nucleotide sequence of light chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena leggera:”

“Amino acid sequence of light chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

TAVOLA 31/155

Figura 3V

“Nucleotide sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena pesante:”

“Amino acid sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

“Nucleotide sequence of light chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena leggera:”

“Alternative Nucleotide sequence of light chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica alternativa di regione variabile di catena leggera:”

“Amino acid sequence of light chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

TAVOLE 32-37/155

Figure 3W-3BB

“Nucleotide sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena pesante:”

“Amino acid sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

“Nucleotide sequence of light chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena leggera:”

“Amino acid sequence of light chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

TAVOLA 38/155

Figura 3CC

“Nucleotide sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena pesante:”

“Amino acid sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

“Nucleotide sequence of light chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena leggera:”

“Amino acid sequence of light chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

“Alternative Nucleotide sequence of light chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica alternativa di regione variabile di catena leggera:”

TAVOLE 39-45/155

Figure 3DD-3JJ

“Nucleotide sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena pesante:”

“Amino acid sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

“Nucleotide sequence of light chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena leggera:”

“Amino acid sequence of light chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

TAVOLA 46/155

Figura 3KK

“Constant Domains” = “Domini costanti”

“Human IgG2:” = “IgG2 umana:”

“Human IgG4:” = “IgG4 umana:”

“Human lambda:” = “Lambda umana:”

“Human kappa:” = “Kappa umana”

TAVOLE 47-63/155

Figura 3LL-3BBB

“Nucleotide sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena pesante:”

“Amino acid sequence of heavy chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

“Nucleotide sequence of light chain variable region:” = “Sequenza nucleotidica di regione variabile di catena leggera:”

“Amino acid sequence of light chain variable region:” = “Sequenza amminoacidica di regione variabile di catena pesante:”

TAVOLA 64/155

Figura 3CCC

“Heavy variable” = “Variabile pesante”

“Germline” = “Linea germinale”

TAVOLA 65/155

Figura 3DDD

“Heavy variable” = “Variabile pesante”

TAVOLA 66/155

Figura 3EEE

“Kappa variable” = “Variabile kappa”

“Lambda variable” = “Variabile lambda”

“Germline” = “Linea germinale”

TAVOLA 67/155

Figura 3FFF

“Kappa variable” = “Variabile kappa”

“Lambda variable” = “Variabile lambda”

TAVOLA 68/155

Figura 3GGG

“Germline” = “Linea germinale”

TAVOLA 70/155

Figura 3III

“Germline” = “Linea germinale”

TAVOLA 72/155

Figura 4A

“10 or 100pM” = “10 o 100 pM”

“% Free 16F12” = “% di 16F12 libero“

TAVOLA 73/155

Figura 4B

“10 or 100pM” = “10 o 100 pM“

“% Free 31H4.1” = “% di 31H4.1 libera“

TAVOLA 74/155

Figura 4C

“10 or 100pM” = “10 o 100 pM“

“% Free 16F12” = “% di 16F12 libero“

TAVOLA 75/155

Figura 4D

“10 or 100pM” = “10 o 100 pM“

“% Free 31H4.1” = “% di 31H4.1 libera“

TAVOLA 76/155

Figura 4E

“% Free 16F12” = “% di 16F12 libero“

TAVOLA 77/155

Figura 4F

“% Free 31H4.1” = “% di 31H4.1 libera“

TAVOLA 78/155

Figura 5A

“Non-reducing” = “Non riducente“

“Reducing” = “Riducente“

“12% Tris-Glycine gel, QuickBlue stain, 1µg/Lane” = “Gel Tris 12%-glicina, tinta QuickBlue, 1 µg/corsia“

“Marker 12” = “Marker 12“

“SeeBlu Plus2” =

TAVOLE 79-80/155

Figure 5B-5C

“% Free hPCSK9” = “% di hPCSK9 libera”

TAVOLA 81/155

Figura 5D

“Binding of 1.56 ~ 100nM 21812 to mPCSK9 captured on penta-his Ab.” = “Legame di 1,56 ~ 21812 100 nM contro mPCSK9 catturato su Ab penta-his.”



“Resp. Diff (RU)” = “Diff. risposta (RU)”

“Time (s)” = “Tempo (s)”

TAVOLA 82/155

Figura 5E

“Epitope Binning of anti-PCSK9 Abs on hPCSK9” = “Binning epitopico di Ab anti-PCSK9 su hPCSK9”

“Binding (RU)” = “Legame (RU)”

TAVOLE 83-86/155

Figure 6A-6D

“Sigmoidal dose-response” = “Dose-risposta sigmoidale”

“Best-fit values” = “Valori di migliore adattamento”

“BOTTOM” = “FONDO”

“TOP” = “TOP”

“% Inhibition” = “Inibizione %”

“[Ab]” = “[Ab]”

TAVOLE 87-90/155

Figure 7A-7D

“% of Inhibition” = “% di inibizione”

“Log[Ab]” = “Log[Ab]”

TAVOLA 91/155

Figure 8A-8B

“Total Cholesterol” = “Colesterolo totale”

“Time (hr)” = “Tempo (h)”

TAVOLA 92/155

Figure 8C-8D

“Time (hr)” = “Tempo (h)”

TAVOLA 93/155

Figura 9

“ β -actin” = “ β -actina”

TAVOLA 94/155

Figura 10A

“Total Cholesterol” = “Colesterolo totale”

“Time (days)” = “Tempo (giorni)”

Figura 10B

“Time (days)” = ”Tempo (giorni)”

TAVOLA 95/155

Figura 10C

“Total Cholesterol” = “Colesterolo totale”

“Time (days)” = ”Tempo (giorni)”

TAVOLA 96/155

Figura 11A

“Sacrifice n=*” = “Sacrificio n=*”

“into all mice” = “in tutti i topi”

“Dose 31H4 or IgG” = “Dose 31H4 o IgG”

TAVOLA 97/155

Figura 11B

“Total Cholesterol” = “Colesterolo totale”

“Time (days)” = ”Tempo (giorni)”

“IgG at D3/D10” = ”IgG in D3/D10”

“31H4 at D3/D10” = ”31H4 in D3/D10”

TAVOLA 98/155

Figura 12A

“Ab” = “Ab”

“Actin” = “Actina”

“Relative Levels of LDLR” = “Livelli relativi di LDLR”

TAVOLA 101/155

Figura 12D

“Ab” = “Ab”

“Actin” = “Actina”

“Relative Levels of LDLR” = “Livelli relativi di LDLR”

TAVOLA 104/155

Figura 13A

“Light Chain” = “Catena leggera”

“light” = “leggera”

“Consensus” = “Consenso”

TAVOLA 105/155

Figura 13B

“light” = “leggera”



“substitutions per 100 residues” = “sostituzioni per 100 residui”

TAVOLA 108/155

Figura 13C

“Heavy Chain” = “Catena pesante”

“heavy” = “pesante”

“Consensus” = “Consenso”

TAVOLA 107/155

Figura 13D

“heavy” = “pesante”

“substitutions per 100 residues” = “sostituzioni per 100 residui”

TAVOLA 108/155

Figura 13E

“light” = “leggera”

“heavy” = “pesante”

“substitutions per 100 residues” = “sostituzioni per 100 residui”

TAVOLA 109/155

Figura 13F

“Consensus for Group 1” = “Consenso per il Gruppo 1”

“Consensus for Group 2” = “Consenso per il Gruppo 2”

“light” = “leggera”

“heavy” = “pesante”

TAVOLA 110/155

Figura 13G

“Consensus for Group 3” = “Consenso per il Gruppo 3”

“Consensus for Group 4” = “Consenso per il Gruppo 4”

“light” = “leggera”

“heavy” = “pesante”

TAVOLA 111/155

Figura 13H

“Group 1 (11 members)” = “Gruppo 1 (11 membri)”

“CONSENSUS” = “CONSENSO”

“Group 2 (6 members)” = “Gruppo 2 (6 membri)”

TAVOLA 112/155

Figura 13I

“Group 2, continued” = “Gruppo 2, continua”

“Heavy chain” = “Catena pesante”

“CONSENSUS” = “CONSENSO”

TAVOLA 113/155

Figura 13J

“Group 3 (13 members)” = “Gruppo 3 (13 membri)”

“Group 4 (2 members)” = “Gruppo 4 (2 membri)”

“CONSENSUS” = “CONSENSO”

TAVOLA 114/155

Figura 14

“LDL-C change from baseline, percent (SE)” = “cambio del C-LDL dalla linea basale, percentuale (SE)”

“Days after first dose” = “Giorni dopo la prima dose”

“Cohort *” = “Coorte*”

“Study treatments administered” = “Trattamenti in studio somministrati”

“Once weekly (QW)” = “Una volta alla settimana (QW)”

“Every 2 weeks (Q2W)” = “Ogni 2 settimane (QW)”

“Every 4 weeks (Q4W)” = “Ogni 4 settimane (Q4W)”

“SE: standard error” = “SE: errore standard”

TAVOLA 115/155

Figura 15

“Baseline PCSK9, mean (SD)” = “PCSK9 di linea basale, media (SD)”

“Cohort *” = “Coorte*”

“LDL-C change from baseline, percent (SE)” = “cambio del C-LDL dalla linea basale, percentuale (SE)”

“Days After First Dose” = “Giorni dopo la prima dose”

“Cohort 3, Q2W, Low-to moderate-dose statin” = “Coorte 3, Q2W, statina a dose da bassa a moderata”

“Cohort 6, Q2W, High-dose statin” = “Coorte 6, Q2W, dose alta di statina”

“Study treatments administered every 2 weeks (Q2W)” = “Trattamenti in studio somministrati ogni 2 settimane (Q2W)”

“SE: standard error” = “SE: errore standard”

TAVOLA 116/155

Figura 16

“ApoB, percent change from baseline (SE)” = “ApoB, cambio percentuale dalla linea basale (SE)”

“Days after first dose” = “Giorni dopo la prima dose”

“Cohort *” = “Coorte*”

“Study treatments administered” = “Trattamenti in studio somministrati”

“Once weekly (QW)” = “Una volta alla settimana (QW)”

“Every 2 weeks (Q2W)” = “Ogni 2 settimane (QW)”

“Every 4 weeks (Q4W)” = “Ogni 4 settimane (Q4W)”

“SE: standard error” = “SE: errore standard”

TAVOLA 117/155

Figura 17

“Low-to moderate-dose statin cohorts” = “Coorti di statina a dose da bassa a moderata”

“High-dose statin cohorts” = “Coorti di statina a dose alta”

“Cambio di LP (a) dalla linea basale, percentuale (SE)” =

“Outliers or subjects with baseline or screening values below the lower limit of quantitation were excluded from the analysis.” = “Outlier o soggetti con valori di linea basale o screening al di sotto del limite inferiore di quantificazione sono stati esclusi dall’analisi.”

“SE: standard error, QW: once weekly; Q2W: every 2 weeks; Q4W: every 4 weeks” = “SE: errore standard, QW: una volta alla settimana; Q2W: ogni 2 settimane; Q4W: ogni 4 settimane”

TAVOLA 118/155

Figura 18

“LDL-C change from baseline, percent (SE)” = “cambio del C-LDL dalla linea basale, percentuale (SE)”

“Placebo HeFH cohort” = “Coorte con HeFH placebo”

“21B12 HeFH cohort” = “Coorte con HeFH placebo”

“Days After First Dose” = “Giorni dopo la prima dose”

“Study treatments administered” = “Trattamenti in studio somministrati”

“SE: standard error: “SE: errore standard Q2W: every 2 weeks” = Q2W: ogni 2 settimane”

TAVOLA 119/155

Figura 19

“PCSK9, percent change from baseline (SE)” = PCSK9, cambio percentuale dalla linea basale (SE)”

“Placebo HeFH cohort” = “Coorte con HeFH placebo”

“21B12 HeFH cohort” = “Coorte con HeFH placebo”

“Days After First Dose” = “Giorni dopo la prima dose”

“Study treatments administered” = “Trattamenti in studio somministrati”

“SE: standard error: “SE: errore standard Q2W: every 2 weeks” = Q2W: ogni 2 settimane”

TAVOLA 120/155

Figura 20

“Total cholesterol, percent change from baseline (SE)” = “Colesterolo totale, cambia percentuale dalla linea di base (SE)”

“Placebo HeFH cohort” = “Coorte con HeFH placebo”

“21B12 HeFH cohort” = “Coorte con HeFH placebo”

“Days After First Dose” = “Giorni dopo la prima dose”

“Study treatments administered” = “Trattamenti in studio somministrati”

“SE: standard error: “SE: errore standard Q2W: every 2 weeks” = Q2W: ogni 2 settimane”

TAVOLA 121/155

Figura 21

“Non-HDL-C, percent change from baseline (SE)” = “C-non HDL, cambio percentuale dalla linea basale (SE)”

“Placebo HeFH cohort” = “Coorte con HeFH placebo”

“21B12 HeFH cohort” = “Coorte con HeFH placebo”

“Days After First Dose” = “Giorni dopo la prima dose”

“Study treatments administered” = “Trattamenti in studio somministrati”

“SE: standard error: “SE: errore standard Q2W: every 2 weeks” = Q2W: ogni 2 settimane”

TAVOLA 122/155

Figura 22

“ApoB, percent change from baseline (SE)” = “ApoB, cambio percentuale dalla linea basale (SE)”

“Placebo HeFH cohort” = “Coorte con HeFH placebo”

“21B12 HeFH cohort” = “Coorte con HeFH placebo”

“Days After First Dose” = “Giorni dopo la prima dose”

“Study treatments administered” = “Trattamenti in studio somministrati”

“SE: standard error: “SE: errore standard Q2W: every 2 weeks” = Q2W: ogni 2 settimane”

TAVOLA 123/155

Figura 23

“Change from baseline, percent (SE)” = “Cambio dalla linea basale, percentuale (SE)”

“21B12 Q2W (3 doses), HeFH subjects” = “21B12 Q2W (3 dosi), soggetti affetti da HeFH”

“21B12, dose-matched non-HeFH subjects” = “21B12, soggetti non affetti da HeFH combinati per dose” =

“Placebo, HeFH subjects” = “Placebo, soggetti affetti da HeFH”

“SE: standard error” = “SE: errore standard”

TAVOLA 124/155

Figure 24A-24B

“% change from baseline in Calc LDL-C” = “% di cambio dalla linea basale in Calc C-LDL”

“Week” = “Settimana”

TAVOLA 125/155

Figura 25A

“% Δ from baseline relative to pbo at W12” = “% Δ dalla linea basale relativamente a pbo in W12

“All $p < 0.001$ ” = “All $p < 0,001$ ”

Figura 25B

“% Δ from baseline relative to pbo at W12” = “% Δ dalla linea basale relativamente a pbo in W12”

TAVOLA 126/155

Figure 25C-25D

“% Δ from baseline relative to pbo at W12” = “% Δ dalla linea basale relativamente a pbo in W12”

TAVOLA 127/155

Figura 26

“Viscosity” = “Viscosità

“Stabilizer/Excipient” = “Stabilizzante/eccipiente”

“Control” = “Controllo”

“Alanine” = “Alanina”

“Arginine” = “Arginina”

“Calcium Chloride” = “Cloruro di calcio”

“Carnitine” = “Carnitina”

“Creatinine” = “Creatinina”

“Glycerol” = “Glicerolo”

“Glycine” = “Glicina”

“Lysine” = “Lisina”

“Magnesium Chloride” = “Cloruro di magnesio”

“Methionine” = “Metionina”

“Proline” = “Prolina”

“Serine” = “Serina”

“Sodium Chloride” = “Cloruro di sodio”

“Sodium sulfate” = “Solfato di sodio”

“Sucrose” = “Saccarosio”

“Taurine” = “Taurina”

“Zinc Chloride” = “Cloruro di zinco”

TAVOLA 128/155

Figura 27

“Viscosity” = “Viscosità

“Concentration” = “Concentrazione”

“Control” = “Controllo”

“3% Proline” = “Prolina 3%”

TAVOLE 129-132/155

Figura 28A-28D

“Viscosity” = “Viscosità

“Protein Concentration” = “Concentrazione di proteina”

TAVOLE 133-134/155

Figure 29A-29B

“Cumulative counts per mL” = “Conte cumulative per ml”

“Formulation” = “Formulazione”

TAVOLA 135/155

Figura 30A

“Cumulative counts/mL” = “Conte cumulative/ml”

“10 μ M Particles” = “Particelle di 10 μ M”

TAVOLA 136/155

Figura 30B

“Cumulative counts/mL” = “Conte cumulative/ml”

“25 μ M Particles” = “Particelle di 25 μ M”

TAVOLA 137/155

Figura 31

“proprotein convertase” = “proproteina convertasi”

TAVOLA 142/155

Figura 36

“Time following injection (days)” = “Tempo dopo l’iniezione (giorni)”

TAVOLA 143/155

Figura 37

“Total Cholesterol” = “Colesterolo totale”

“Time following injection (days)” = “Tempo dopo l’iniezione (giorni)”

TAVOLA 144/155

Figura 38

“Time following injection (days)” = “Tempo dopo l’iniezione (giorni)”

TAVOLA 145/155

Figura 39

“Serum Antibody Concentration” = “concentrazione sierica di anticorpo”

TAVOLA 146/155

Figura 40

“Antibody” = “Anticorpo”

“Apparent $t_{1/2}$ (h)” = “ $t_{1/2}$ apparente (h)”

TAVOLA 147/155

Figura 41

“ $p < 0.02$ to 0.0001 ” = “ $p < 0,02$ a $0,0001$ ”

“Time following administration (days)” = “Tempo dopo somministrazione (giorni)”

TAVOLA 148/155

Figura 42

“Total Cholesterol” = “Colesterolo totale”

“Time following administration (days)” = “Tempo dopo somministrazione (giorni)”

“ $p < 0.0004$ to 0.01 ” = “ $p < 0,0004$ a $0,01$ ”

TAVOLA 149/155

Figura 43

“Time following administration (days)” = “Tempo dopo somministrazione (giorni)”

TAVOLA 150/155

Figura 44

“Triglycerides” = “Trigliceridi”

“Time following administration (days)” = “Tempo dopo somministrazione (giorni)”

TAVOLA 151/155

Figura 45

“Time following administration (days)” = “Tempo dopo somministrazione (giorni)”

“ $p < 0.04$ to 0.0001 ” = “ $p < 0.04$ a $0,0001$ ”

TAVOLA 152/155

Figura 46

“Serum Antibody Concentration” = “concentrazione sierica di anticorpo”

“Time following administration (days)” = “Tempo dopo somministrazione (giorni)”

TAVOLA 153/155

Figura 47

“Mean ($\pm$ SD) Pharmacokinetic Parameters” = “Parametrici farmacocinetici medi ($\pm$ SD)”

“Antibody” = “Anticorpo”

TAVOLA 154/155

Figura 48A

“Light Chain Variable Sequence Comparison and Consensus Sequence (HCDR1, HCDR2 and HCDR3 are underlined):” = Confronto di sequenze variabili di catena leggera e sequenza consenso (HCDR1, HCDR2 e HCDR3 sono sottolineate):”

“Light Chain Variable Sequence” = “Sequenza variabile di catena leggera”

“Consensus:” = “Consenso:”

“ X_1 is H or D; X_2 is F or L; and X_3 is T or A” = “ X_1 è H o D; X_2 è F o L; e X_3 è T o A”

TAVOLA 155/155

Figura 48B

“Heavy Chain Variable Chain Sequence Comparison And Consensus Sequence (HCDR1, HCDR2 and HCDR3 are underlined):” = Confronto di sequenze variabili di catena pesante e sequenza consenso (HCDR1, HCDR2 e HCDR3 sono sottolineate):”

“Heavy Chain Variable Sequence” = “Sequenza variabile di catena pesante”

“Consensus:” = “Consenso:”

“ X_1 is S or N; X_2 is S or T; X_3 is K or R; X_4 is A or T; X_5 is Nor T; X_6 is K or R; X_7 is Y or F; X_8 is D or P; X_9 is D or A; X_{10} is I or L; X_{11} is D or H; and X_{12} is Q or H” = “ X_1 è S o N; X_2 è S o T; X_3 è K o R; X_4 è A o T; X_5 è Nor T; X_6 è K o R; X_7 è Y o F; X_8 è D o P; X_9 è D o A; X_{10} è I o L; X_{11} è D o H; e X_{12} è Q o H”

Traduzione conforme al testo originale del brevetto concesso dall’Ufficio Europeo dei Brevetti.

Un Mandatario



Dott. Giancarlo Reposio
No. Iscr. Albo 1168BM

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'G. Reposio', located at the bottom right of the page.

FIG. 1A
SEQ ID NO:1

QEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPFHGTTATFHRCADPWRLPGTYVVVLKEE
THLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELAKLPHV
DYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHRE
IEGRVMVTDVFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSL
RVLNCQGKGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNAACQRLA
RAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVD
LFAPGEDIIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRL
IHFSAKDVINEAWFPEDQRVLTPLNVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRM
ATAIARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCAHNAFGGEGVYAIAR
CCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSSHWEVEDLGTHKPPVLR
PRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGI PAPQGQVTVACEEGWTLTGC
SALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEEAVTAVAI CCRSRHLAQASQE
LQ

Lejla

FIG. 1B-1

```

      10      20      30      40      50
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : atgggcaccgtcagctccaggcgggtcctgggtggccgctgccactgctgct SEQ ID NO:2
Frame1 : M G T V S S R R S W W P L P L L L SEQ ID NO:3

      60      70      80      90     100
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : gctgctgctgctgctcctgggtcccgccggcgcccgctgcgcaggaggacg
Frame1 : L L L L L L G P A G A R A Q E D E

      110     120     130     140     150
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : aggacggcgactacgaggagctgggtgctagccttgcgctccgaggaggac
Frame1 : D G D Y E E L V L A L R S E E D

      50      160     170     180     190     200
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : ggcctggcggaagcaccgcgagcaggaaccacagccaccttccaccgctg
Frame1 : G L A E A P E H G T T A T F H R C

      210     220     230     240     250
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : cgccaaggatccgtggaggttgccctggcacctacgtggtggtgctgaagg
Frame1 : A K D P W R L P G T Y V V V L K E

      50      260     270     280     290     300
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : aggagacccacctctcgcagtcagagcgactgcccgcgcctgcaggcc
Frame1 : E T H L S Q S E R T A R R L Q A

      310     320     330     340     350
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : caggctgcccgcgggggatacctcaccaagatcctgcatgtcttccatgg
Frame1 : Q A A R R G Y L T K I L H V E H G

      50      360     370     380     390     400
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : ccttcttctggttctggtgaagatgagtgccgacctgctggagctgg
Frame1 : L L P G F L V K M S G D L L E L A

      410     420     430     440     450
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : ccttgaagttgcccctgctcgaactacatcgaggaggactcctctgtcttt
Frame1 : L K L P H V D Y I E E D S S V F

      50      460     470     480     490     500
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : gccagagcatcccgagggaacctggagcggattacccctccggggtaccg
Frame1 : A Q S I P W N L E R I T P P R Y R

      510     520     530     540     550
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : ggcggtatgaataaccagcccccgaggaggcagcctgggtggaggtgtatc
Frame1 : A D E Y Q P P D G G S L V E V Y L

```

FIG. 1B-2

```

50      560      570      580      590      600
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : tcctagacaccagcatacacagtgaccaccgggaaatcgagggcagggtc
Frame1 : L D T S I Q S D H R E I E C R V

610      620      630      640      650
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : atggtcaccgaattcgagaatgtgcccaggaggacgggacccgcttcca
Frame1 : M V T D F E N V P E E D G T R F H

50      660      670      680      690      700
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : cagacaggccagcaagtgtgacagtcacgcccacccactggcaggggtgg
Frame1 : R Q A S K C D S H G T H L A G V V

710      720      730      740      750
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : tcagcggccgggatgcccgcgtggcccaagggtgccagcatgcgcagcctg
Frame1 : S G R D A G V A K G A S M R S L

50      760      770      780      790      800
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : cgcgtgctcaactgccaaagggaagggcacgggttagcggcaccctcatagg
Frame1 : R V L N C Q G K G T V S G T L I G

810      820      830      840      850
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : cctggagtttattcggaagccagctggtccagcctgtggggccactgg
Frame1 : L E F I R K S Q L V Q P V G P L V

50      860      870      880      890      900
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : tgggtgctgctgcccctggcgggtgggtacagccgcgtcctcaacgcggcc
Frame1 : V L L P L A G G Y S R V L N A A

910      920      930      940      950
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : tgccagcgcctggcgagggtgggtcgtgctggtcaccgctgccggcaa
Frame1 : C Q R L A R A G V V L V T A A G N

50      960      970      980      990      1000
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : cttccgggaacgatgcctgcccctactccccagcctcagctcccaggtca
Frame1 : F R D D A C L Y S P A S A P E V I

1010      1020      1030      1040      1050
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : tcacagttggggccaccaatgccagggaccagccggtgacccctggggact
Frame1 : T V G A T N A Q D Q P V T L G T

50      1060      1070      1080      1090      1100
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : ttggggaccaactttggccgctgtgtggacctctttgccccagggaggga
Frame1 : L G T N F G R C V D L F A P G E D

```

FIG. 1B-3

```

100      1110      1120      1130      1140      1150
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : catcattggtgcctccagcgactgcagcacctgctttgtgtcacagagtgc
Frame1 : I I G A S S D C S T C F V S Q S G

150      1160      1170      1180      1190      1200
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : ggacatcacaggctgctgcccacgtggctggcattgcagccatgatgctg
Frame1 : T S Q A A A H V A G I A A M M L

200      1210      1220      1230      1240      1250
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : tctgccgagccggagctcacccctggccgagttgagggcagagactgatcca
Frame1 : S A E P E L T L A E L R Q R L I H

250      1260      1270      1280      1290      1300
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : cttctctgccaaagatgtcatcaatgaggcctggttccctgaggaccagc
Frame1 : F S A K D V I N E A W F P E D Q R

300      1310      1320      1330      1340      1350
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : gggtaactgaccccccaacctgggtggccgcccctgccccccagcaccatggg
Frame1 : V L T P N L V A A L P P S T H G

350      1360      1370      1380      1390      1400
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : gcagggtggcagctgttttgcaggactgtgtggtcagcacactcgggggc
Frame1 : A G W Q L F C R T V W S A H S G P

400      1410      1420      1430      1440      1450
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : tacacggatggccacagccatcgcccgtgcccagatgaggagctgc
Frame1 : T R M A T A I A R C A P D E E L L

450      1460      1470      1480      1490      1500
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : tgagctgctccagttttctccaggagtgggaagcggcggggcgagcgcctg
Frame1 : S C S S F S R S G K R R G E R M

500      1510      1520      1530      1540      1550
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : gagggccaagggggcaagctggtctgcccggcccacaacgcttttggggg
Frame1 : E A Q G G K L V C R A H N A F G G

550      1560      1570      1580      1590      1600
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : tgaggggtgtctacgccattgccagggtgctgctgctaccccaggccaact
Frame1 : E G V Y A I A R C C L L P Q A N C

600      1610      1620      1630      1640      1650
-----|-----|-----|-----|-----|
Query : gcagcgtccacacagctccaccagctgaggccagcatggggaccgctgctc
Frame1 : S V H T A P P A E A S M G T R V

```

FIG. 1B-4

```

        650      1660      1670      1680      1690      1700
        -----|-----|-----|-----|-----|
Query   : cactgccaccaacagggccacgtctctcacaggctgcagctcccactggga
Frame1  : H C H Q Q G H V L T G C S S H W E

        700      1710      1720      1730      1740      1750
        -----|-----|-----|-----|-----|
Query   : ggtggaggacotttggcaccacacaagccgcctgtgtgaggccacgaggtc
Frame1  : V E D L G T H K P P V L R P R G Q

        750      1760      1770      1780      1790      1800
        -----|-----|-----|-----|-----|
Query   : agcccaaccagtgctgtggccacagggaggccagcatccacgttctctgc
Frame1  : F N Q C V G H R E A S I H A S C

        800      1810      1820      1830      1840      1850
        -----|-----|-----|-----|-----|
Query   : tgccatgccccaggtctggaatgcaaagtcaaggagcatggaatcccggc
Frame1  : C H A P G L E C K V K E H G I P A

        850      1860      1870      1880      1890      1900
        -----|-----|-----|-----|-----|
Query   : ccctcaggggcaggtgacogtggcctgcgaggagggtggaccctgactg
Frame1  : P Q G Q V T V A C E E G W T L T G

        900      1910      1920      1930      1940      1950
        -----|-----|-----|-----|-----|
Query   : gctgcagcgcctctccctgggacatccacgtctctgggggcttacgcgta
Frame1  : C S A L P C T S H V L G A Y A V

        950      1960      1970      1980      1990      2000
        -----|-----|-----|-----|-----|
Query   : gacaacacgtgtgttagtcaggagccgggacgtcagcactacaggcagcac
Frame1  : D N T C V V R S R D V S T T G S T

                2010      2020      2030      2040      2050
                -----|-----|-----|-----|-----|
Query   : cagcgaagaggccgtgacagccgttgccatctgtctgccggagccggcacc
Frame1  : S E E A V T A V A I C C R S R H L

        50      2060      2070      2080      2090      2100
        -----|-----|-----|-----|-----|
Query   : tggcgcaggcctcccaggagctccag
Frame1  : A Q A S Q E L Q

```

FIG. 2A

Seq ID	LINE	V	D	J	FRL	CDRL	FR2
No.		Germline					
4	30A4	A3		JK3	DIVMTQSPPLSLPVTPGEPASISCS	RSSQSLHSGNYLD	WYQKPGQSPQLLIY
5					-----S-----p-----	-----F-N-----	-----
6		Germline			DIQMTQSPSSISASVGDRVITTC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPKLLIY
7	3C4	O2		JK4	-----	-----R-N--S-----	-----I-----
8		Germline			DIQMTQSPSSISASVGDRVITTC	RASQSISSYLN	WYQKPGKAPKLLIY
9	23B5	O2		JK5	--L-----	-----	-----V-----
10	25G4	O2		JK5	-----	-----I-----	-----Y-----
11		Germline			QSVLTQPPSVSGAPQQRVTISC	TGSSSNIGAGYDVH	WYQQLPCTAPKLLIY
12	31H4	V1-13		JL2	-----	-----	-----S-----
13	27B2	V1-13		JL2	-----	-----H-----	-----V-----
14		Germline			QSALTQPPASVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGGYNYVS	WYQQHPGKAPKIMTY
15	25A7	V1-4		JL2	-----	-----R--S-----	-----H-----V-----
16	27H5	V1-4		JL2	-----	-----S-----	-----P-----
17	26H5	V1-4		JL2	-----	-----S-----	-----P-----
18	31D1	V1-4		JL2	-----	-----S-----	-----P-----
19	20D10	V1-4		JL2	-----	-----S-----	-----Y--P--K-----
20	27E7	V1-4		JL2	-----	-----S-----	-----P-----
21	30B9	V1-4		JL2	-----	-----S-----	-----P-----
22	19H9	V1-4		JL2	-----	-----N-----S-----	-----P-----
23	26E10	V1-4		JL2	-----	-----S-----	-----
23	21B12	V1-4		JL2	-----	-----S-----	-----
24	17C2	V1-4		JL2	-----	-----A--S-----	-----R-----

FIG. 2B

Seq ID	LINE	V	D	J	FRL	CDRL	FR2
No.							
25	23G1	Germline V1-4		JL3	QSALTQPASVSGSPGQSIITSC	TGTSSDVGGNYVS	WYQQHPGKAPKLLIY
26					-----S--		-----
27		Germline			QSALTQPASVSGSPGQSIITSC	TGTSSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLLIY
28	13H1	V1-7		JL3	L-----N-----		-----YS-----
29		Germline			QSVLTQPPSASGTGQRTVISC	SGSSSNIGSNTVN	WYQQLEGTAPKLLIY
30	9C9	V1-16		JL3	-----K-----		-----V-----
31	9H6	V1-16		JL3	-----P-----		-----
32	31A4	V1-16		JL3	-----		-----
33	1A12	V1-16		JL3	-----K-----		-----F-----
34		Germline			QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLEGTAPKLLIY
35	16F12	V1-19		JL1	-----F-----		-----
36	22E2	V1-19		JL1	-----F-----		-----
37	27A6	V1-19		JL1	-----F-----		-----F-----
38	28B12	V1-19		JL1	-----F-----		-----
39	28D6	V1-19		JL1	-----T-----		-----
40	31G11	V1-19		JL1	-----F-----		-----
41		Germline			QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLEGTAPKLLIY
42	13B5	V1-19		JL2	-----N-----		-----
43		Germline			SYELTQPPSVSVSPGQIASITC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQSPVLVIY
44	31B12	V2-1		JL2	-----R-----		-----
45		Germline			QPVLTQPPSASASLGASVTLTC	TLSSGYSNYKVD	WYQQRPCKGPRFVNR
46	3B6	V5-2		JL2	-----LF-----	-----S-E-----	-----

FIG. 2C

Seq ID No.	LINE	CDR2	FR3	CDR3	FR4
4	30A4	LGSNRAS --H--	GVPDFRFGSGSGTDFTLISRVEAEDVGYYC -----E-----	MQALQTFPT --V-----	FGPGTKVDIK -----
6	3C4	AASSLQS -----	GVPSRFSGSGSGTDFTLTSSSQPEDFATYYC -----S-----	QQSYSTPLT -----I-----	FGGTVKEIK -----
8	23B5	AASSLQS -----	GVPSRFSGSGSGTDFTLTSSSQPEDFATYYC -----N-----	QQSYSTPIT -----S-----	FGQGRLEIK -----
10	25G4	--A--	-----	-----A--	-----
11	31H4	GNSNRPS -----	GVPDFRFGSGSGTASLITGLQAEDEADYYC -----	QSYDSSLSGSV -----N--V--	FGGTKLVVL -----
12	27E2	--TY--	-----	-----	-----
14	25A7	EVSNRPS -----	GVSNRFGSGSGNTASLTISGLQAEDEADYYC --T-----	SSYTSSSVV -----	FGGTKLVVL -----
15	25A7v1	-----	--T-----	-----	-----
16	27H5	-----	I-----	-----T-M-	-----
17	27H5v1	-----	I-----	-----T-M-	-----
18	26H5	-----	I-----	-----T-M-	-----
19	31D1	-----	-----	-----T-M-	-----A--
20	20D10	-----	-----	-----T-M-	-----
21	27E7	-----	-----	-----T-M-	-----
22	30B9	-----	-----	-----T-M-	-----
23	19H9	-----	I-----	-----T-M-	-----
24	19H9v1	-----	I-----	-----T-M-	-----
25	26E10	-----	-----	N-----T-M-	-----
26	21B12	-----	-----	N-----T-M-	-----
27	17C2	-----	-----	-----TNM-	-----

FIG. 2D

Seq ID No.	LINE	CDR2	FR3	CDR3	FR4
25		EVSNRPS	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEADYYC	SSYTSSS V	FGGGTKLTIVL
26	23G1	--T---	-----	N-----T-M-	-----
27		EGSKRPS	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEADYYC	CSYAGSST	FGGGTKLTIVL
28	13H1	-V-----	-----	-----LV	-----
29		SNNQRPS	GVPDRFSGSKSGTSASLASISGLQSEADYYC	AAWDDSLN V	FGGGTKLTIVL
30	9C9	R-----L	-----	-----W-	-----
31	9H6	---R---	-----	-----W-	-----
32	31A4	-----	-----	-V-----GWV	-----
33	1A12	---R---	-----	-----W-	-A-----
34		DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSATLGIUGLQTGDEADYYC	GTWDSSLSAYV	FGTGTKVTIVL
35	16F12	-Y-----	-----	-----	-----R-
36	22E2	-Y-----	-----	-----G-	-----R-
37	27A6	-Y-----	-----	-----S-	-----R-
38	28B12	-Y-----	-----	-----G-	-----R-
39	28D6	-Y-----	-----	-----G-	-----R-
40	31G11	-S-----	-----D-	-----	-----
41		DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSATLGIUGLQTGDEADYYC	GTWDSSLSAYV	FGGGTKLTIVL
42	13B5	-----	-----N-	-----	-----
43		QDSKRPS	GIPDRFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTAVV	FGGGTKLTIVL
44	31B12	-NT-W-L	-----K-----V-	-----V-	-----
45		VGTCGIVGSKGD	GIPDRFVLSGLNRYLTITKNIQEEESDYHC	GADHGSGSNFVVV	FGGGTKLTIVL
46	3B6	-D-----E	-----	-----T-	-----
45		VGTCGLV	GSKGDGIPDRFVLSGLNRYLTITKNIQEEDE	SDYRCGADHGSGSNFVVV	FGGGTKLTIVL
46	3B6v1	-D-----	-----E-	-----T-	-----

FIG. 3A

Seq ID	LINE	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
No.							
47		Germline			QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYGIS	WVRQAPGQGLEWMG
48	20D10	VH1-18		JH6B	-I-----	--PL-----	-----
49	26E10	VH1-18		JH6B	-----	--L-----	-----
49	21B12	VH1-18		JH6B	-----	--L-----	-----
50	23G1	VH1-18		JH6B	-----	--L-----	-----
51	26H5	VH1-18		JH6B	-----	--L-----	-----
52	27H5	VH1-18		JH6B	-----	--L-----	-----
53	31D1	VH1-18		JH6B	-I-----	--L-----	-----
54	27E7	VH1-18		JH6B	-----	--SL-----	-----
55	30B9	VH1-18		JH6B	-----	--PL-----	-----
56	19H9	VH1-18		JH6B	-----	--AL-----	-----
57	17C2	VH1-18		JH6B	-----	--S-----	-----
58	25A7	VH1-18		JH6B	-----	--P-----	-----
59		Germline			QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYGIS	WVRQAPGQGLEWMG
60	3B6	VH1-18		JH4B	-----	-----	-----
61		Germline			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYWMS	WVRQAPGKGLEWVA
62	9H6	VH3-7	D7-27	JH3A	-----	--R-----	-----
63		Germline			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYWMS	WVRQAPGKGLEWVA
64	9C9	VH3-7	D7-27	JH3B	-----	--L-----	-----
65	1A12	VH3-7	D7-27	JH3B	-----	--L-----	-----
66		Germline			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYMN	WVRQAPGKGLEWVS
67	31H4	VH3-21	D3-3	JH3A	-----	-----	-----
68		Germline			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
69	13B5	VH3-23		JH4B	-----	-----	-----

FIG. 3B

Seq ID	LINE	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
No.							
70		Germline			EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
71	23B5	VH3-23	D2-8	JH4B	----	-----N	----
72	25G4	VH3-23	D2-8	JH4B	----	-----N	----
73		Germline			QVQLVESGGGVQPGRSIRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
74	30A4	VH3-33		JH6B	----	-----	----
75		Germline			QVQLVESGGGVQPGRSIRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
76	27A6	VH3-33	D6-6	JH6B	--H-----	---N-F---	----
77	28B12	VH3-33	D6-6	JH6B	----	-----F-	----
289	28B12v1	VH3-33	D6-6	JH6B	--H-----	-----F-	----
78	28D6	VH3-33	D6-6	JH6B	----	-----F-	----
79	16F12	VH3-33	D6-6	JH6B	--H-----	---N-F---	----
80	22E2	VH3-33	D6-6	JH6B	----	-----F-	----
81	31B12	VH3-33	D6-6	JH6B	----	-----	----
290	31B12v1	VH3-33	D6-6	JH6B	----	-----	-----C-
82		Germline			QVQLVESGGGVQPGRSIRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
83	31G11	VH3-33	D6-19	JH6B	----	---R-----	----
84		Germline			QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVS	GGSISSGGYWS	WIRQHPGKGLEWIG
85	3C4	VH4-31		JH6B	----	-----SD-	----
86		Germline			QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVS	GGSISSGGYWS	WIRQHPGKGLEWIG
87	27B2	VH4-31	D5-5	JH4B	----	-----	----
88		Germline			QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY	GGSFSGYWS	WIRQHPGKGLEWIG
89	31A4	VH4-34	D6-6	JH4B	----	-----A--N	----
90		Germline			QVQLQQSGPGLVKPSQTLTCAIS	GDSVSSNSAAWN	WIRQSPSRGLEWLG
91	13H1	VH6-1		JH4B	----	-----	----

FIG. 3C

Seq ID No.	LINE	CDR2	FR3	CDR3	FR4
47		WISAYNGNTNYAQKIQG	RVMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	YGMADV	WGQGTITVTVSS
48	20D10	-----V-----	-----V-----	G-----	-----
49	26E10	-V-F-----	-----P-----	G-----	-----
49	21B12	-V-F-----	-----P-----	G-----	-----
50	23G1	-V-F-----	-----P-----	G-----	-----
51	26H5	---F-----	-----V-----	G-----	-----
52	27H5	---V-----	-----V-----S	G-----	-----
53	31D1	---F-----	-----V-----F	G-----	-----
54	27E7	---V-----	-----V-----V	G-----	-----
55	30B9	---V-----	-----V-----	G-----	-----
56	19H9	---V-----	-----V-----	G-----	-----
57	17C2	-V-----F-----	-----V-----	G-V-----	-----
58	25A7	-----E-----	-----V-----F	G-V-----	-----
59		WISAYNGNTNYAQKIQG	RVMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	GY DY	WGQGTITVTVSS
60	3B6	---T-----	-----V-----	---TR---	-----
61		NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR	NWG AFDV	WGQGTITVTVSS
62	9H6	---H-----	-----	ES---F-----	---H-----
63	9C9	NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR	NWG AFDI	WGQGTITVTVSS
64		-----	-----	ES---F-----	-----
65	1A12	-----	-----S-T-	ES---F-----	-----
66		SISSSSYYIYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR	DYDFWSGYTAFDV	WGQGTITVTVSS
67	31H4	-----S-----	-----F-----	---A---D---	-----
68		AISGSGGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR	FDY	WGQGTITVTVSS
69	13B5	T-----R-----	-----	EVGSP---	-----

FIG. 3D

Seq ID No.	LINE	CDR2	FR3	CDR3	FR4
70		AISGSGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	VLMVYA DY	WGQGTTLVTVSS
71	23B5	T-----DN-----	-----	KF-----ML--	-----
72	25G4	T-----N-----	-----	KF-----ML--	-----
73		VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	YYYGMDV	WGQGTTLVTVSS
74	30A4	-----D-----	-----	ETGPLKL-----	-----
75		VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	IAA GMDV	WGQGTTLVTVSS
76	27A6	L--S-----D-----	-----	AIAALYYY--	-----
77	28B12	L--N-----	-----	AIAALYYY--	--H-----
78	28D6	L--N-----	-----	AIAALYYY--	-----
79	16F12	L--S-----DE-----	-----	AIAALYYY--	-----
80	22E2	L--N-----	-----	AIAALYYY--	-----
291	22E2v1	L--N-----	-----	AIAALYYY--	-----
81	31B12	I-----	-----	RGGLAARPG--	-----
292	31B12v1	I-----	-----	RGGL-----PG--	-----
82		VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GIAVAYYYGMDV	WGQGTTLVTVSS
83	31G11	L--E-----T--V-----	-----	-----	-----
84		YIYSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCAR	YYYGMDV	WGQGTTLVTVSS
85	3C4	-----L-----	-----	GGVTI-----A--	-----
86		YIYSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCAR	EDTAMV YFDY	WGQGTTLVTVSS
87	27B2	-----N-----	-----	-----P-----	-----
88		EINHSGSTNYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCAR	GQLV FDY	WGQGTTLVTVSS
89	31A4	-----R-D-----	-----K-----N-----	-----P-----	-----
90		RTYYRSKWYNDYAVSVKS	RITINPDTSKNQFSQLNSVTPEDTAVYYCAR	FDY	WGQGTTLVTVSS
91	13H1	-----KN-S-----	-----G-----	GGPTAA---	-----

FIG. 3E

31H4

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCATGAACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGT
TACATTTCTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
TTTCTGTGCGAGAGATTACGATTTTGGAGTGCTTACTATGATGCTTTTGATGTCTGG
GGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTCA3' (SEQ ID NO: 152)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYISY
ADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDYDFWSAYYDAFDVWGQGT
MVTYSS (SEQ ID NO: 67)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACACTGGT
ACCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCAACTCCTCATCTCTGGTAAACAGCAATCGGC
CCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG
CCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACA
GCAGCCTGAGTGGTTCGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ
ID NO: 153)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLISGNSNRPSGV
PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGSGSVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO: 12)

FIG. 3F

20D10

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGATTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC
CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACCCCTTGACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGGTC
CAGGGCAGCGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGTCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCT3' (SEQ ID NO: 92)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPLTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WISAYNGNTNYAQKVQGSVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYYCAR
GYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 48)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGTACCCAGGCAAACCCCCCAAACCTCAA
GATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCAT
GGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO: 93)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQYPGKPPKLKIYE
VSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGG
TKLTVL (SEQ ID NO: 19)

FIG. 3G

26E10

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTAACCAGCTATGGTATCAG
CTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGGTCAGT
TTTATAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGGCACCA
TGACCACAGACCCATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAG
ATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTC
TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCT3' (SEQ ID NO: 94)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWVS
FYNGNTNYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGMDV
WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 49)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGA
TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTC
TCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACATGATTTATGAGG
TCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC
AACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATT
ATTACTGCAATTCATATACAAGCACCAGCATGGTATTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO: 95)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIEVSN
RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCNSYTSTSMVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO: 23)

Alternative Nucleotide sequence of light chain variable region (26E10v1):

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGA
TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTC
TCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACATGATTTATGAGG
TCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC
AACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATT
ATTACTGCAACTCATATACAAGCACCAGCATGGTATTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO: 293)

FIG. 3H

26H5

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGC
CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTGACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGATCAGCTTTTACAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGGTC
CAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGTCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCT3' (SEQ ID NO: 96)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WISFYNGNTNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYYCAR
GYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 51)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAATCAT
GATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTATTTCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCAT
GGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO: 97)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMY
EVSNRPSGVSIKFSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGG
TKLTVL (SEQ ID NO: 17)

FIG. 3I

31D1

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGATTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC
CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTGACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGATCAGCTTTTACAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGGTC
CAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGTCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTTCTGT
GCGAGAGGTTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 98)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WISFYNGNTNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYFCAR
GYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 53)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTCTGTCTCGTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACATCAT
GATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCAT
GGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGGCCGTCCTA3' (SEQ ID NO: 99)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMY
EVSNRPSGVSNRFSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGG
GTKLAVL (SEQ ID NO: 18)

FIG. 3J

23G1

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC
CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTAACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGGTCAAGTTTTATAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGCTC
CAGGGCAGAGGCACCATGACCACAGACCCATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 100)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WVSFYNGNTNYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
GYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 50)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACATCAT
GATTTATGAGGTCACCTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAACTCATATACAAGCACCAGCA
TGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO: 101)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIY
EVTNRPSGVSNRFSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCNSYTSTSMVFGG
GTKLTVL (SEQ ID NO: 26)



FIG. 3K

27B2

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACA
GACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGT
GGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAG
TGGATTGGGTACATATATAACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCC
CTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCT
CCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTG
TGCGAGAGAGGATACAGCTATGGTTCCTTACTTTGACTACTGGGGCCAG
GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 102)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGISSGYYWSWIRQHPGKGLEWIG
YIYNSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDT
AMVPYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 87)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTACTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCCAGGGCA
GAGGGTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCACA
TTATGATGTGCACTGGTACCAGCAGGTTCCAGGAACAGCCCCAAACT
CCTCATCTATGGTAACACCTATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCT
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCC
AGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAACAGCC
TGAGTGGTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3'
(SEQ ID NO: 103)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAHYDVHWYQQVPGTAPKLLIY
GNTYRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDNSLSGVVF
GGGTKLTVL (SEQ ID NO: 13)



FIG. 3L

16F12

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAACAGCTTT
GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCACTTATCTGGTCTGATGGAAGTGATGAATACTATGCAGACTCCGTGA
AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG
CGAGAGCCATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGG
GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 104)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSFGMHVVRQAPGKGLEWVA
LIWSDGSDEYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARA
IAALYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 79)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACA
GAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAA
TTTTGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTC
ATTTATGACTATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTG
GCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAGA
CTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGA
GTGCTTATGTCTTCGGAAGTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' (SEQ ID
NO: 105)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDY
NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAYVFGT
GTRVTVL (SEQ ID NO: 35)



FIG. 3M

22E2

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGCAGCTTT
GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCACTTATATGGAATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT
GCGAGAGCCATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGG
GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 106)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVA
LIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
AIAALYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 80)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCCAGGACA
GAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAA
TTTTGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTC
ATTTATGACTATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTG
GCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAGA
CTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGTCTGA
GTGGTTATGTCTTCGGAACCTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' (SEQ ID
NO: 107)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDY
NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSGYVFGT
GTRVTVL (SEQ ID NO: 36)

FIG. 3N

27A6

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAACAGCTTT
GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCACTTATATGGTCTGATGGAAGTGATAAATACTATGCAGACTCCGTGA
AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG
CGAGAGCCATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGG
GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 108)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKGLEWVA
LIWSDGSDKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARA
IAALYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 76)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACA
GAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGTTCCAACATTGGGAATAAT
TTTGTATCCTGGTACCAGCAGTTCCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTCA
TTTATGACTATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCCTGACCGATTCTCTGG
CTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACC GGACTCCAGACT
GGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGAGT
TCTTATGTCTTCGGAACCTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' (SEQ ID
NO: 109)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQFPGTAPKLLIYDY
NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSSYVFGT
GTRVTVL (SEQ ID NO: 37)

FIG. 30

28B12

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGCAGCTTT
GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCACTTATATGGAATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT
GCGAGAGCCATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGG
GGCCACGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 110)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVA
LIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
AIAALYYYYGMDVWGHGTTVTVSS (SEQ ID NO: 77)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACA
GAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAA
TTTTGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTC
ATTTATGACTATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTG
GCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAGA
CTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGA
GTGGTTATGTCTTCGGAACCTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' (SEQ ID
NO: 111)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDY
NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSGYVFGT
GTRVTVL (SEQ ID NO: 38)

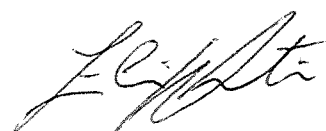


FIG. 3P

28D6

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGCAGCTTTGGCATGCA
CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACTTAT
ATGGAATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG
ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG
AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCC
ATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 112)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVA
LIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
AIAALYYYYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 78)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCACAGTGTCTGCGGCCCCAGGACA
GAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAA
TTTTGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTC
ATTTATGACTATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTG
GCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAGA
CTGGGGACGAGGCCGATTACTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGA
GTGGTTATGTCTTCGGAACCTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' (SEQ ID
NO: 113)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPTVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDY
NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSGYVFGT
GTRVTVL (SEQ ID NO: 39)

FIG. 3Q

31G11

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGGAGCTAT
GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCACTTATATGGCATGATGGAAGTAATACATACTATGTAGACTCCGTGA
AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG
CGAGAGGTATAGCAGTGGCTTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGG
GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 114)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWV
ALIWHDGSNTYYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGIAVAYYYYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 83)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACA
GAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAA
TTTTGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTC
ATTTATGACAGTAATAAGCGACCCCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTG
GCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGACATCACCGGACTCCAGA
CTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGA
GTGCTTATGTTTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTA3' (SEQ ID
NO: 115)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDS
NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLDITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAYVFGT
GTKVTVL (SEQ ID NO: 40)



FIG. 3R

23B5

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTAT
GCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC
TCAACTATTAGTGGTAGTGGTGATAACACATACTACGCAGACTCCGTGA
AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTG
CGAAAAAGTTTGTACTAATGGTGTATGCTATGCTTGACTACTGGGGCCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 116)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMNWVRQAPGKGLEWVS
TISGSGDNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKK
FVLMVYAMLDYWQGQTLVTVSS (SEQ ID NO: 71)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGA
GACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGTTAT
TTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGTCCTGATC
TATGCTGCCTCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCA
GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGTCTGCAACCTGA
AGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTTCCCCCATCACC
TTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA3' (SEQ ID NO: 117)

Amino acid sequence of light chain variable region:

DILMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKVLIIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQPEDFATYYCQQSYSSPITFGQGRLE
IK (SEQ ID NO: 9)



FIG. 3S

25G4

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTAT
GCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC
TCAACTATTAGTGGTAGTGGTGGTAACACATACTACGCAGACTCCGTGA
AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTG
CGAAAAAGTTTGTACTAATGGTGTATGCTATGCTTGACTACTGGGGCCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 118)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWRQAPGKGLEWVS
TISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKK
FVLMVYAMLDYWGGQTLTVSS (SEQ ID NO: 72)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTATCTGCATCTGTAGGA
GACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCATCTAT
TTAAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTTACCTCCTGATCT
ATGCTGCAGCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCA
GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGA
AGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTGCCCCCATCACC
TTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA3' (SEQ ID NO: 119)

Amino acid sequence of light chain variable region:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISYLNWYQQKPGKAPYLLIYAAA
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSYSAPITFGQGRLE
IK (SEQ ID NO: 10)



FIG. 3T

27E7

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC
CTCACTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACAGTTTGACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGGTC
CAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGTCTAC
ATGGAGGTGAGGAGTCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 120)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVQSGAEVKKPGASLKVSCKASGYSLTSGISWVRQAPGQGLEWMG
WISAYNGNTNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMEVRSLSDDTAVYYCAR
GYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 54)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACATCAT
GATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAATACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCAT
GGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO: 121)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMY
EVSNRPSGVSNRFSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGG
GTKLTVL (SEQ ID NO: 20)



FIG. 3U

27H5

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAGGCCTGGGGC
CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTGACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGATCAGCGTTTACAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGGTC
CAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGTCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGCTCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 122)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WISVYNGNTNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLSSDDTA VYYCAR
GYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 52)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACATCAT
GATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTATTCTGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCAT
GGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO: 123)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMY
EVSNRPSGV SIRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGG
TKLTVL (SEQ ID NO: 16)



FIG. 3V

30B9

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA
GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACCCCTTGACCAGCTATGGTATCAG
CTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGC
GCTTACAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGGTCCAGGGCAGAGTCACCA
TGACCACAGACACATCCACGAGCACAGTCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAG
ATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTC
TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 124)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPLTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISA
YNGNTINYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGMDV
WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 55)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGA
TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTC
TCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACACTCATGATTTATGAGG
TCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC
AATACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATT
ATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO: 125)

Alternative Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGA
TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTC
TCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACACTCATGATTTATGAGG
TCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC
AACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATT
ATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO: 294)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIEVSN
RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO: 21)



FIG. 3W

19H9

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTTTCAGTTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC
CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACGCCTTGACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGGTC
CAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGTCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 126)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYALTSYGISWVRQAPGQGLEWM
GWISAYNGNTNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYYCA
RGYGMDEVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 56)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAACAGTGACGTTGGTGGTTATA
ACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACATCAT
GATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGATTCTAATCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCAT
GGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO: 127)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTNSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMY
EVSNRPSGISNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGG
TKLTVL (SEQ ID NO: 22)



FIG. 3X

17C2

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC
CTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACAGCTTTACCAGCTAT
GGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG
GGATGGGTCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGTTC
CAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAAGTGAAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGCTACGTTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 128)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSTSYGISWVRQAPGQGLEWMG
WVSA YNGNTNYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCA
RGYVMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 57)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTTTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGCTTATA
ACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACGCA
TGATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTC
TGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAG
GCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATAACAAGCACCAAC
ATGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:
129)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGAYNSVSWYQQHPGKAPKRMIY
EVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSTNMVFGG
GTKLTVL (SEQ ID NO: 24)



FIG. 3Y

13H1

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTACAGTTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCA
GACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAAC
AGTGCTGCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAG
TGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAAAAATTATTCA
GTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAAC
CAGTTCTCTCTGCAACTGAACTCTGTGACTCCCGGGGACACGGCTGTGT
ATTACTGTGCAAGAGGGGGGCCAACTGCTGCTTTTGAAGTACTGGGGCC
AGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 130)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLG
RTYYRSKWKYKNYSVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPGDTAVYYCAR
GGPTAAFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 91)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CTTTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAG
TCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGGAATTATA
ACCTTGTCTCCTGGTACCAACAGTATTCAGGCAAAGCCCCAAACTCAT
GATTTATGAGGTCAGTAAGCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACAATCTCTGGGCTCCAGG
CTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCTGCTCATATGCAGGTAGTAGCAC
TTTGGTTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:
131)

Amino acid sequence of light chain variable region:

LSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGNYNLVSQYQQYSGKAPKLMY
EVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSSTLVFG
GGTKLTVL (SEQ ID NO: 28)



FIG. 3Z

9C9

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGTCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTATT
GGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGG
CCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGA
AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTG
CGAGAGAGTCAAACCTGGGGATTTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGA
CAATGGTCACCGTCTCTTCA3' (SEQ ID NO: 132)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSQFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVA
NIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE
SNWGFADFIDWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 64)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCA
GAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAA
GACTGTAAACTGGTACCAACAGGTCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCT
CATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTTAGGGGTCCCTGACCGATTCTCT
GGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGT
CTGAGGATGAGGCTGATTATTATTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGA
ATTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:
133)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVNWFYQQVPGTAPKLLIYRN
NQRPLGVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNWVFGG
GTKLTVL (SEQ ID NO: 30)



FIG. 3AA

9H6

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTCGCTATT
GGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGG
CCAACATAAAGCATGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGA
AGGGCCGATTACCATTTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG
CGAGAGAGTCAAAGTGGGGATTTGCTTTTGATGTCTGGGGCCACGGGA
CAATGGTCACCGTCTCTTCA3' (SEQ ID NO: 134)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVA
NIKHDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE
SNWGFAPDVWGHGTMVTVSS (SEQ ID NO: 62)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGCCCCCGGACA
GAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAAT
ACTGTAAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAAGTCTCCTC
ATCTATAGTAATAATCGGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTG
GCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTC
TGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAA
TTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:
135)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPSASGPPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSN
NRRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNWVFGG
GTKLTVL (SEQ ID NO: 31)



FIG. 3BB

13B5

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTAT
GCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC
TCAACTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGGACATATTACGCAGACTCCGTGA
AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTG
CGAAAGAAGTTGGCAGTCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGG
TCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 136)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVST
ISGSGGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEV
GSPFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 69)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACA
GAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAACTCCAACATTGGGAATAA
TTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTC
ATTTATGACAATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTG
GCTCCAACCTCTGGCACGTGAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAGA
CTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGA
GTGCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID
NO: 137)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSNSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYD
NNKRPSGIPDRFSGSNSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAVVFG
GGTKLTVL (SEQ ID NO: 42)



FIG. 3CC

31B12

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGC
ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATG
GTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGA
GAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGAGGGGGGGTCTGGCAGC
TCGTCCGGGCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
TCA3' (SEQ ID NO: 138)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAHWY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGGLAARP
GGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 81)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCTGTGTCCCCAGGACAGACA
GCCAGAATCACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATATGCTTGCTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAAATACCAA
GTGGCCCTTAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGGAACACA
GTCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACT
GTCAGGCGTGGGACAGCAGCACTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGAC
CGTCCTA3' (SEQ ID NO: 139)

Amino acid sequence of light chain variable region:

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDKLGD KYACWYQQKPGQSPVLVIYQNTKWP
LGIPERFSGSKSGNTVLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO: 44)

Alternative Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACA
GCCAGAATCACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATATGCTTGCTGGT
ATCAGCAGAAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAAATACCAA
GTGGCCCTTAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGGAACACA
GTCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACT
GTCAGGCGTGGGACAGCAGCACTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGAC
CGTCCTA3' (SEQ ID NO: 295)



FIG. 3DD

3C4

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACA
GACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGT
GATTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAG
TGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCC
TCAAGAGTCGAATTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCTGTTCTC
CCTGAAGTTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGGGGGGGTGACTIONACTACTACGCTATGGACGTCTGGGGC
CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 140)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSDYYSWIRQHPGKGLEWIG
YIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNLFSCLKSSVTAADTAVYYCARGGV
TYYYAMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 85)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'GACATACAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA
GACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGCGCATTAGCAACTAT
TTAAGTTGGTATCTGCAGAAACCAGGGATTGCCCTAAGCTCCTGATCT
ATGCTGCATCCAGTTTGCAGAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCA
GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAATCTGA
AGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGCTCATT
TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA3' (SEQ ID NO: 141)

Amino acid sequence of light chain variable region:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRISNYLSWYLQKPGIAPKLLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQSEDFATYYCQQSYSTPLIFGGGKVE
IK (SEQ ID NO: 7)



FIG. 3EE

30A4

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTAT
GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCAGTTATATGGTATGATGGAAGTGATAAATACTATGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT
GCGAGAGAGACTGGTCCCTTGAAACTCTACTACTACGGTATGGACGTCT
GGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 142)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
VIWYDGSDKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ETGPLKLYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 74)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGTCCGTCACCCCTGGA
GAGCCGCCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTA
ATGGATACAACTTTTTGAATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCC
ACAACTCCTGATCTATTTGGGTTCTCATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGAC
AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGGAAATCAGC
AGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGTTCTAC
AAACTCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA3'
(SEQ ID NO: 143)

Amino acid sequence of light chain variable region:

DIVMTQSPLSLSVTPGEPPSISRSSQSLH SNGYNFLNWYLQKPGQSPQLLI
YLGSHRASGV PDRFSGSGSGTDFTLEISRVEAEDVGVYYCMQVLQTPFTFG
PGTKVDIK (SEQ ID NO: 5)

Lepti

FIG. 3FF

1A12

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGG
GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACCTTTAGTAA
CTTTTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG
TGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGG
ACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA
TTCACGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT
GTGTATTCCTGTACGAGAGAGTCAAACCTGGGGATTTGCTTTTGATAT
CTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA3' (SEQ ID NO:
144)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSNFWMSWVRQAPGKGLEW
VANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYS
CTRESNWGFADFQGMVTVSS (SEQ ID NO: 65)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGC
AGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGT
AAAACGTAAACTGGTACCAGCAGTTCCCAGGAACGGCCCCCAAAC
TCCTCATCTATAGTAATAATCGGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGA
TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGG
GCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATG
ACAGCCTGAATTGGGTGTTTCGGCGCAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
3' (SEQ ID NO: 145)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVNWWYQQFPGTAPKLLIYS
NNRRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNWW
FGAGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)



FIG. 3GG

3B6

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG
GCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAG
CTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT
GGATGGGATGGATCAGCACTTACAATGGTAACACAACTATGCACA
GAAGGTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGC
ACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCG
TTTATTACTGTGCGAGAGGGTATACTCGGGACTACTGGGGCCAGGGA
ACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO: 146)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEW
MGWISTYNGNTNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY
YCARGYTRDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 60)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACTTTTTGCATCAGCCTCCCTGGGAG
CCTCGGTCACTCACCTGCACCCTGAGCAGCGGCTACAGTAGTTAT
GAAGTGGACTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAGGGCCCCCGGTTTG
TCATGCGAGTGGACACTGGTGGGATTGTGGGATCCAAGGGGGAAGG
CATCCCTGATCGCTTCTCAGTTTTGGGCTCAGGCCTGAATCGGTATCT
GACCATCAAGAACATCCAGGAAGAGGATGAGAGTGACTACCACTGT
GGGGCAGACCATGGCAGTGGGACCAACTTCGTGGTGGTATTCGGCG
GAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO: 147)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QPVLTQPLFASASLGASVTLTCTLSSGYSSYEVDWYQQRPGKGPRFVM
RVDTTGGIVGSKGEGIPDRFSVLGSLNRYLTIKNIQEEDESDYHCGADH
SGGTNFFVVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 46)



FIG. 3HH

31A4

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCG
GAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGC
GTACTACTGGAACTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAG
TGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGGAAGAACCGACTACAACCCGT
CCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAAGCA
GTTCTCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGT
ATTACTGTGCGAGAGGGCAGCTCGTCCCCTTTGACTACTGGGGCCAG
GGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCA3' (SEQ ID NO: 148)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWNWIRQPPGKGLEWI
GEINHSGRDTDYNPSLKSRTISVDTSKKQFSLKLNSVTAADTAVYYCAR
GQLVPFDYWGGTLTVSS (SEQ ID NO: 89)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGC
AGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGT
AATACTGTAAATTGGTATCAGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAAT
CCTCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGAT
TCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGG
CTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGTATGGGATGA
CAGCCTGAATGGTTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC
CTA3' (SEQ ID NO: 149)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIY
SNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAVWDDSLNG
WVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 32)



FIG. 3II

25A7

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG
GCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTCCCAG
CTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT
GGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGCAGA
GAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGC
ACAGCCTACATGGAGGTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCG
TGTTTTACTGTGCGAGAGGCTACGTTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCT3' (SEQ ID NO: 150)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFPSYGISWVRQAPGQGLEW
MGWISAYNGNTNYAEKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEVRSLSDDTAVF
YCARGYVMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 58)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGAC
AGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTCGT
TATAATTCTGTCTCCTGGTACCAACACCACCCAGGCAAAGCCCCCAA
AGTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTACTC
GCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCT
GGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATAC
AAGCAGCAGCGTTGTATTCTGGCGGAGGGACCAAACTGACCGTCCTA
3' (SEQ ID NO: 151)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGRYNSVSWYQHHPGKAPKVM
IYEVSNRPSGVSTRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSVVF
GGGTKLTVL (SEQ ID NO: 15)



FIG. 3JJ

21B12

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG
GCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTAACCAG
CTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT
GGATGGGATGGGTCAGTTTTTATAATGGTAACACAACTATGCACAG
AAGCTCCAGGGCAGAGGCACCATGACCACAGACCCATCCACGAGCA
CAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGT
GTATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCT3' (SEQ ID NO: 94)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEW
MGWVSFYNGNTNYAQKLQGRGTMTPSTSTAYMELRSLRSDDTAVY
YCARGYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 49)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGAC
AGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGT
TATAACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAA
ACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATC
GCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCT
GGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAATTCATATAC
AAGCACCAGCATGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
3' (SEQ ID NO: 296)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLM
IYEVSNRPSGVSNRFSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCNSYTSTSMV
FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 23)

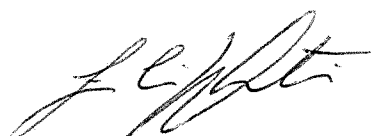


FIG. 3KK

Constant Domains

Human IgG2:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTV
ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNG
KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 154)

Human IgG4:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 155)

Human lambda:

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
AGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT
VAPTECS (SEQ ID NO: 156)

Human kappa:

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVT
KSFNRGEC (SEQ ID NO: 157)



FIG. 3LL

5H5.1

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG
GGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCA
CCGGCTACTATATACACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGG
CTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTCACAGTGGTGGCGCAAA
CTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACA
CGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCT
GACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCAACTGGAATA
CGACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:418)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQVVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGL
EWMGWINPHSGGANYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSD
TAVYYCARGNWNVDYYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:419)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGT
AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTA
GCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTA
AGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCAT
CTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA
TCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTTCTGTCAAA
GGTATCAGATTGCCCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAGGTGG
ATATCAAA3' (SEQ ID NO:420)

Amino acid sequence of light chain variable region:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKLL
IYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYFCQRYQIAPF
TFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:421)



FIG. 3MM

24F7.1

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCA
GTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATCTGGTATGATGGAAGTACTAAATAC
TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACAAT
TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGA
GGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACCA
CTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:422)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVIWYDGSTKYYADSVKGRSTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCARSVAGYHYHYGMDVWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 423)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAGGCT
ATTATGCAACCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCTGTA
CTTGTCATCTATGGTAAAACTACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCC
CGGGACAGCATTGGTAACCATCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:424)

Amino acid sequence of light chain variable region:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSL RGYyatWYQQKPRQAPVLV
IYGKNYRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSIG
NHLVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:425)



FIG. 3NN

22B11.1

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCA
GTAGCTATGGCTTGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTAGATGGAAGTAATAAATA
CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTAC
CACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGT
CACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:426)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGLHWVRQAPGKGLE
WVAVIWL DGSNKYYADSVKGRSTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARSVAGYHYHYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:427)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAAGTT
ATTATGGAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCTGTGTA
CTTGTCATCTTTGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAATC
ACGGGACATCATTGGTGACCATCTGCTGTTTCGGCGGAGGGACCA
AGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:428)

Amino acid sequence of light chain variable region:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYGSWYQQKPRQAPVLVI
FGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDIIGD
HLLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:429)



FIG. 300

30F1.1

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGTCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCA
GGA ACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGATGGAAGTAATAAATAC
TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACAAT
TCCAAGAACACGCTGTATCTGCTAATGAACAGCCTGAGAGCCGA
GGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACCA
CTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCA3'(SEQ ID NO:430)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVIWFDGSNKYYADSVKGRSTISRDN SKNTLYLLMNSLRAEDT
AVYYCARSVAGYHYYYGMDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:431)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAGGGAGACAGCCTCAGAAGCT
ATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCTTGTA
CTTGTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGAATCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAAATC
CCGGGACATCATTGGTGACCATCTGGTGTTCCGGCGGAGGGACCA
AACTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:432)

Amino acid sequence of light chain variable region:

SSELTQDPAVSV ALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPRQAPVLVI
YGKNNRPSGIPDRISGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDIIGD
HLVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:433)



FIG. 3PP

24B9.1

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCA
GTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATA
CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAGATCGGGGACTGGAC
TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID
NO:434)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCVRDRGLDWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:435)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAGGCT
ATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCTGTGTA
CTTGTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAAGTC
CCGGGACAGCAGTGGTGACCATCTGGTGTTCCGGCGGAGGGACCA
AGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:436)

Amino acid sequence of light chain variable region:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSL RGYASWYQQKPRQAPVLV
IYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDSSG
DHLVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:437)



FIG. 3QQ

24B9.2

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCA
GTA ACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATTTGGTATGATGGAAGTAGTAAATAC
TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACAAT
TCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGA
GGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACCA
CTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:438)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQVVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVIWYDGSSKYYADSVKGRSTISRDN SKNTVYLQMNSLRAED
TAVYYCARSVAGYHYYYGMDVWGQGT VTVSS (SEQ ID NO:439)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAGGCT
ATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCTGTGTA
CTTGTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAAGTC
CCGGGACAGCAGTGGTGACCATCTGGTGTTTCGGCGGAGGGACCA
AGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:440)

Amino acid sequence of light chain variable region:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSL RGY YASWYQQKPRQAPVLV
IYGKNNRPSGIPDRFSGTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDSSG
DHLVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:441)



FIG. 3RR

20A5.1

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGTCTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCA
GTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTTATAAAGA
CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACA
ACTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCTGTGTATTATTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTAC
CACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGT
CACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:442)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVESGGGVVQPGRSLSLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE
WVAVIWYDGSYKDYADSVKGRSTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARSVAGYHYHYGMDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:443)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAACCT
ATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCTATT
CTTGTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAATCACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAAATC
CCGGGACATCATTGGTAACCATCTGCTGTTTCGGCGGAGGGACTAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:444)

Amino acid sequence of light chain variable region:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPRQAPILVI
YGKNNRPSGIPDRFSGSTSGITASLTITGAQAEDEADYYCKSRDIIGN
HLLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:445)



FIG. 3SS

20A5.2

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGCGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCCTCA
GTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTCATATGGTATGATGGAAGTAACAAATA
CTATGCAGCCTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGTGGTTTCGGGG
AGTCATCGCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:446)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVASGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSSYGMHWVRQAPGQGL
EWVAVIWYDGSNKYYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCARGGSGSHRYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID
NO:447)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAACCT
ATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCTATT
CTTGTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAATCACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAAATC
CCGGGACATCATTGGTAACCATCTGCTGTTCGGCGGAGGGACTAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:448)

Amino acid sequence of light chain variable region:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPRQAPILVI
YGKNNRPSGIPDRFSGSTSGITASLTITGAQAEDEADYYCKSRDIIGN
HLLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:449)



FIG. 3TT

20E5.1 – version1 (v1)

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCA
GTA ACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAGGTAATAAATA
CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCATCATCTCCAGAGACAA
TTCCAAGAGCACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTTTATTATTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACC
ATTATTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCGCCTCA3' (SEQ ID NO:450)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQVVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVIWYDGGNKYYADSVKGRSIISRDNSKSTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARSVAGYHYHYGMDVWGQGTTVTVAS (SEQ ID NO:451)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGG
ACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGG
TGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACC
CCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGAT
TTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTG
ACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGC
AGCTCATATACAAGCACCATGATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGGCCGTCCTA3' (SEQ ID NO:452)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPK
LMIYEVSNRPSGISNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTST
SMVFGGGTKLAVL (SEQ ID NO:453)



FIG. 3UU

20E5.1 – version2 (v2)

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCA
GTA ACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAGGTAATAAATA
CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCATCATCTCCAGAGACAA
TTCCAAGAGCACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTTTATTATTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACC
ATTATTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCGCCTCA3' (SEQ ID NO:454)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQVVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVIWYDGGNKYYADSVKGRSISRDNSTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARSVAGYHYHYGMDVWGQGTITVTVAS (SEQ ID NO:455)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGG
ACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAGGCT
ATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCTGTGTA
CTTGTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCACGTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATC
ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTA ACTCC
CGGGACAACATTGGTGACCATCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:456)

Amino acid sequence of light chain variable region:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRYGYYASWYQQKPRQAPVLV
IYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDNIG
DHLVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:457)



FIG. 3VV

8A3.1

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTA
GTAGCTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCCAGCATAAAACAAGATGGAAGTGAGAAATA
CTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CGCCAGGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTTGTATTAATGG
TGTATGATATAGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCC
AAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:458)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLE
WVASIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNARNSLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARDLVLVMYDIDYYYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID
NO:459)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCC
TGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCT
GCATAGTAATGGATACAACCTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCC
AGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGC
CTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACAG
ATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGG
GTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAACTCCGCTCACTTTCGGC
GGAGGGACCAAGGTAGAGATCAAA3' (SEQ ID NO:460)

Amino acid sequence of light chain variable region:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQS
PQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ
ALQTPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:461)



FIG. 3WW

11F1.1

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTA
GTA ACTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCCAGCATAAAACAAGATGGAAGTGAGAAATA
CTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCGCCATCTCCAGAGACAA
CGCCAAGAACTCACTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTTGTACTAATGG
TGTATGATATAGACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCC
AAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:462)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGL
EWVASIKQDGSEKYYVDSVKGRFAISRDNKNSLFLQMNSLRAEDT
AVYYCARDLVLMVYDIDYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID
NO:463)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCT
GGAGAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTG
CATAGTAATGGGTACA ACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCA
GGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC
TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCA GTGGCAGTGGATCAGGCACACAT
CTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGT
TTATTACTGCATGCAA ACTCTACAAACTCCGCTCACTTTTCGGCGG
AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA3' (SEQ ID NO:464)

Amino acid sequence of light chain variable region:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQS
PQLLIYLGSNRASGV PDRFSGSGSHTLTKISRVEAEDVGVYYCMQ
TLQTPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:465)



FIG. 3XX

12H11.1

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGCCCAGCCTG
GGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCA
GTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATACTATGATGGAATTAATAAACAC
TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAT
TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGA
GGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGGGGACTGGACT
GGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:466)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVQLVESGGGVAQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL
EWVAVIYYDGINKHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARDRLDWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:467)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCT
GGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTT
TATACAGCTCCAACAGTAAGAACTACTTAGTTTGGTACCAGCAGA
AACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCCTCTACCC
GGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTG
GCAGTTTATTACTGTCAACAATATTATAGTACTCCGTGGACGTTT
GGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA3' (SEQ ID NO:468)

Amino acid sequence of light chain variable region:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNSKNYLVWYQQKPG
QPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ
QYYSTPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:469)

FIG. 3YY

11H4.1

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACCTTTA
GTAACTTTTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAATGATAAATA
CTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAA
CGCCAAGAATTCACCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGTCAAACCTGGGGA
TTTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCT
TCA3' (SEQ ID NO:470)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSNFWMSWVRQAPGKGL
EWVANIKQDGNDKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED
TAVYYCARESNWGFADFQWQGTMTVSS (SEQ ID NO:471)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGG
GCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGG
AAGTAAACTGTAACTGGTACCAGCAGTTCCCAGGAACGGCCC
CCAACTCCTCATCTATAGTAATAATCGGCGGCCCTCAGGGGTCC
CTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG
CCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTG
CAGCATGGGATGACAGCCTGAATTGGGTGTTTCGGCGCAGGGACC
AAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:472)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVNWKYQFPGTAPKLL
IYSNNRRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDS
LNWVFGAGTKLTVL (SEQ ID NO:473)



FIG. 3ZZ

11H8.1

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTGGTCCAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACCTTTA
GTAACTTTTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATA
CTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAA
CGCCAAGAATTCAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGTCAAACCTGGGGA
TTTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCT
TCA3' (SEQ ID NO:474)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSNFWMSWVRQAPGKGL
EWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARESNWGFADIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO:475)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGG
GCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGG
AAGTAAAACTGTAACTGGTACCAGCAGTTCCCAGGAACGGCCC
CCAAACTCCTCATCTATAGTAATAATCGGCGGCCCTCAGGGGTCC
CTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG
CCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTG
CAACATGGGATGACAGACTGAATTGGGTGTTTCGGCGCAGGGACC
AAGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:476)

Amino acid sequence of light chain variable region:

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVNWWYQQFPGTAPKLL
IYSNNRRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDR
LNWVFGAGTKLTVL (SEQ ID NO:477)



FIG. 3AAA

11G1.5

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCAC
AGAGACCCTCACGCTGACCTGCACCGTCTCTGGGTTCTCACTCAG
CAATGTTAGAATGGGTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGA
AGGCCCTGGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAAATT
CCTACAGAACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGAC
ACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACCATGACCAACATGGACCCT
GTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGGATAGTGGGAGCTAC
AACGGATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAC
CGTCTCTTCA3' (SEQ ID NO:478)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSLSNVRMGVSWIRQPPGKAL
EWLAHIFSNDENSYRTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDAT
YYCARIVGATTDDAFDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:479)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGG
ACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTA
AAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTG
CTGGTCGTCTATGATGATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAG
CGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATC
AGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTTTTACTGTCAGGT
GTGGGATAGTAGTAGTGATCCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCA
AGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:480)

Amino acid sequence of light chain variable region:

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV
VYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADFYCQVWDSS
SDPVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:481)



FIG. 3BBB

8A1.2

Nucleotide sequence of heavy chain variable region:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTA
GTA ACTATTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
CTGGAGTGGGTGGCCAGCATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAGATA
CTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAGACAC
CGCCAAGAACTCTCTGTATCTCCAAATGAACAGCCTGCGAGCCGA
GGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACCTCTTGTACTAATGGT
GTATGCTCTACACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCA
CGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:482)

Amino acid sequence of heavy chain variable region:

EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGL
EWVASIKQDGSERY YVDSVKGRFTISRDTAKNSLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARPLVLMVYALHYYYYGMDVWGHGTTTVTVSS (SEQ ID
NO:483)

Nucleotide sequence of light chain variable region:

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCC
TGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCT
GCATAGTAATGGATACA ACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCC
AGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGC
CTCCGGGGTCCCTGACAGGTT CAGTGGCAGTGGATCAGGCACAG
ATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGG
GTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCGCTCACTTTTCGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA3' (SEQ ID NO:484)

Amino acid sequence of light chain variable region:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSL LHSNGYNYLDWYLQKPGQS
PQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ
ALQTPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:485)



FIG. 3CCC

Heavy variable	SEQ ID NO:	Germline	Germline	FR1	CDR1	FR2
	493	VH1 1-02		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTGYMH	WVRQAPGQGLEWMG
5H5.1G	419	VH1 1-02	JH6	---V-----	-----I-	-----
		Germline	Germline	FR1	CDR1	FR2
	494	VH3 3-33		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
24B9.1G	435	VH3 3-33	JH4	-----	-----	-----
		Germline	Germline	FR1	CDR1	FR2
	495	VH3 3-33		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
24F7.1G	423	VH3 3-33	JH6	-----	-----	-----
22B11.1G	427	VH3 3-33	JH6	-----	-----L-	-----
20A5.1G	443	VH3 3-33	JH6	-----S-	-----	-----
20A5.2G	447	VH3 3-33	JH6	-----A-	-----L-	-----Q-
30F1.1G	431	VH3 3-33	JH6	-----S-	-----RN-	-----
20E5.1G	451	VH3 3-33	JH6	---V-----	---N---	-----
24B9.2G	439	VH3 3-33	JH6	---V-----G-	---N---	-----

FIG. 3DDD

Heavy variable	SEQ ID NO:	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	493	WINPNSGGTNYAQKFG	RVTMTTRDTSTAYMELSRLESDDTAVYYCAR		
5H5.1G	419	---H---A-----	-----	GNWNYDYVGMDV	WGQGTITVTVSS
		CDR2	FR3	CDR3	FR4
	494	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR		
24B9.1G	435	-----	-----V-	DRGLD	WGQGTITVTVSS
		CDR2	FR3	CDR3	FR4
	495	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAR		
24F7.1G	423	-----T-----	-S-----	SVAGYHYVGMDV	WGQGTITVTVSS
22B11.1G	427	---L-----	-S-----	SVAGYHYVGMDV	WGQGTITVTVSS
20A5.1G	443	-----Y-D-----	-S-----	SVAGYHYVGMDV	WGQGTITVTVSS
20A5.2G	447	-----A-----	-----	GGSGSHRYYYGMDV	WGQGTITVTVSS
30F1.1G	431	---F-----	-S-----L-----	SVAGYHYVGMDV	WGQGTITVTVSS
20E5.1G	451	-----G-----	-SI-----S-----	SVAGYHYVGMDV	WGQGTITVTVAS
24B9.2G	439	-----S-----	-S-----V-----	SVAGYHYVGMDV	WGQGTITVTVSS

FIG. 3EEE

Kappa variable	SEQ ID NO:	Germline				FR1	CDR1	FR2
		VL1	VL2	VL3	VL4			
5H5.1K	496	VK1	A20			DIQNTQSPSSLSASVGDRTITC	PASQGISNYLA	WYQOKPGKVPKLLIY
	421	VK1	A20	JK3		-----	---D---	-----
Lambda variable								
20E5.1L v1	497	VL2	2a2			QSALTQPAVSVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGGYNYVS	WYQOHKPGKAPKLMIV
	453	VL2	2a2	JL2		-----	-----S--	-----P-----
30F1.1L	498	VL3	3I			SSELTQDPAVSVALGQIVRITC	QGDLSRSYYAS	WYQOKPGQAPVLVIY
	433	VL3	3I	JL2		-----	-----	-----R-----
22B11.1L	429	VL3	3I	JL2		-----	-----G-	-----R-----F
	437	VL3	3I	JL2		-----	-----G-	-----R-----
24B9.2L	441	VL3	3I	JL2		-----	-----G-	-----R-----
	457	VL3	3I	JL2		-----	-----G-	-----R-----
20E5.1L v2	425	VL3	3I	JL2		-----	-----G---T	-----R-----
	445	VL3	3I	JL2		-----	-----T---	-----R---I----
20A5.1L	449	VL3	3I	JL2		-----	-----T---	-----R---I----
	449	VL3	3I	JL2		-----	-----T---	-----R---I----

Leptin

FIG. 3FFF

Kappa variable	SEQ ID NO:				
	CDR2	FR3	CDR3	FR4	
5H5.1K	496	AASTLQS	GVPSRFSGSGGTDFLTLSLQPEDVATYYC		
	421	-----F-	QRYQIAPFT	FGPGTKVDIK	
Lambda_variable					
	CDR2	FR3	CDR3	FR4	
20E5.1Lv1	497	EVSNRPS	GVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDVATYYC		
	453	-I-----F-	SSYTSTSMV	FGGGTKLAVL	
	CDR2	FR3	CDR3	FR4	
30F1.1L	498	GKNNRPS	GIPDRFGSSSGNTASLTITGAQAEDVATYYC		
	433	-----I--T-----	KSRDIIGDHLV	FGGGTKLTVL	
22B11.1L	429	-----T-----	NSRDIIGDHLV	FGGGTKLTVL	
24B9.1L	437	-----T-----	KSRDSSGDHLV	FGGGTKLTVL	
24B9.2L	441	-----T-----	KSRDSSGDHLV	FGGGTKLTVL	
20E5.1Lv2	457	-----T-----	NSRDIIGDHLV	FGGGTKLTVL	
24F7.1L	425	---Y---	NSRDSIGNHLV	FGGGTKLTVL	
20A5.1L	445	-----T--I-----	KSRDIIGNHLV	FGGGTKLTVL	
20A5.2L	449	-----T--I-----	KSRDIIGNHLV	FGGGTKLTVL	

FIG. 3GGG

	SEQ ID NO:			SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:
		Germline	FR1							
		Germline	FR1							
	486	VH2 226	QVTLKESGPVLYKPTETLTLTCTVS	506	GFSLSNARMGVS	507	WIRQPPGKALEWLA	509		
11G1.5	479	VH2 226	-----	506	-----V-----	508	-----	509		
		Germline	FR1							
		Germline	FR1							
	487	VH3 307	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	510	GFTFSYWMS	511	WVRQAPGKLEWVA	514		
11H8.1	475	VH3 307	-----	510	-L---NP---	512	-----	514		
11H4.1	471	VH3 307	-----	510	-L---NP---	512	-----	514		
8A3.1	459	VH3 307	-----	510	-----N-----	511	-----	514		
11F1.1	463	VH3 307	-----	510	-----N-----	500	-----	514		
8A1.2	483	VH3 307	-----	510	-----N---T	513	-----	514		
		Germline	FR1							
		Germline	FR1							
	488	VH3 3-33	QVQLVESGGGVVQPGERSLRLSCAAS	515	GFTFSYGMH	517	WVRQAPGKLEWVA	518		
12H11.1	467	VH3 3-33	-----A-----	516	-----	517	-----	518		

Leipziger

FIG. 3HHH

	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	486	HIFSNDEKSYSTSLKS	519	ELTTSKDTSKSQVLTMTNMDPVDATATYYCARI	521				
11G1.5	479	-----N--R-----	520	-----	521	VGATTDIAFDI		WGQGITVTVSS	523
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	487	NIKQDGSEKYYVDGVKG	526	RPTISRDNAKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCAR	529				
11H8.1	475	-----	526	-----	529	ESNWGFAPDI		WGQGITVTVSS	523
11H4.1	471	-----ND-----	527	-----	529	ESNWGFAPDI		WGQGITVTVSS	523
8A3.1	459	S-----	501	-----R-----	530	DLVLMVYDIDYYGYGMDV		WGQGITVTVSS	524
11F1.1	463	S-----	501	--A-----F-----	531	DELMLVYDIDYYGYGMDV		WGQGITVTVSS	524
8A1.2	483	S-----R-----	528	-----T-----	532	ELVLMVYALHYHYGYGMDV		WGHGITVTVSS	525
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	488	VIVYDGSNKYYADSVKG	535	RFTISRDNSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR	537				
12H11.1	467	--Y--I--H-----	536	-----	537	DRGLD		WGQGITVTVSS	539

Lepti

	SEQ ID NO:	Germline			SEQ ID NO:	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:
		Germline	Germline	FR1		CDR1		FR2		
	489	VK2 A19		DIWTCQSLSLPVTGPEPASISC	540	RSSQSLLHSNGVNYLD		WYLOKPGQSPQLIY		541
8A1.2	485	VK2 A19	JK4	-----	540	-----		-----		541
8A3.1	461	VK2 A19	JK4	-----	540	-----		-----		541
11F1.1	465	VK2 A19	JK4	-----	540	-----		-----		541
		Germline	Germline	FR1		CDR1		FR2		
	490	VK4 B3		DIWTCQSPDSLAVSLGERATINC	542	KSSQSVLYSSNNRNYLA		WYQKPGQPPKLIY		545
12H11.1	469	VK4 B3	JK1	-----	542	-----S---V		-----		545
		Germline	Germline	FR1		CDR1		FR2		
	491	VL1 1c		QSVLTQPPSASGTPGGRVTISC	546	SGSSSNIGSNTWN		WYQQLPGTAPKLIY		549
11H4.1	473	VL1 1c	JL3b	-----	546	-----K---		---F-----		550
11H8.1	477	VL1 1c	JL3b	-----	546	-----K---		---F-----		550
		Germline	Germline	FR1		CDR1		FR2		
	492	VL3 3h		SVVLTQPPSVSVAPGKTARITC	551	GGNNIGSKSVH		WYQKPGQAPVLIVY		554
11G1.5	481	VL3 3h	JL2	-----Q-----	552	-----		-----V-		555

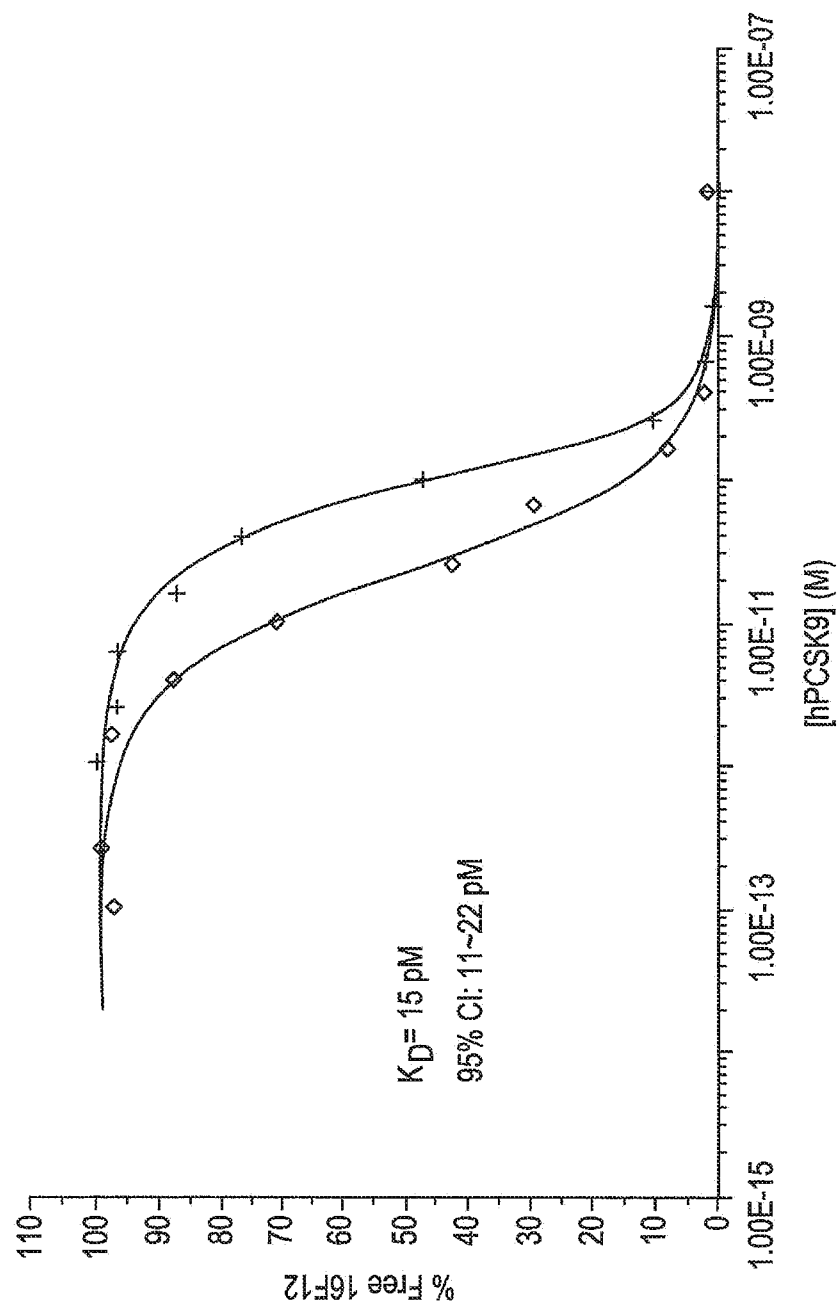
Left

277

Sept 21

FIG. 4A

10 or 100pM 16F 12 + (0.1pM ~ 10nM) hPCSK9



Left

FIG. 4B

10 or 100pM 31H4 + (0.1pM ~ 10nM) hPCSK9

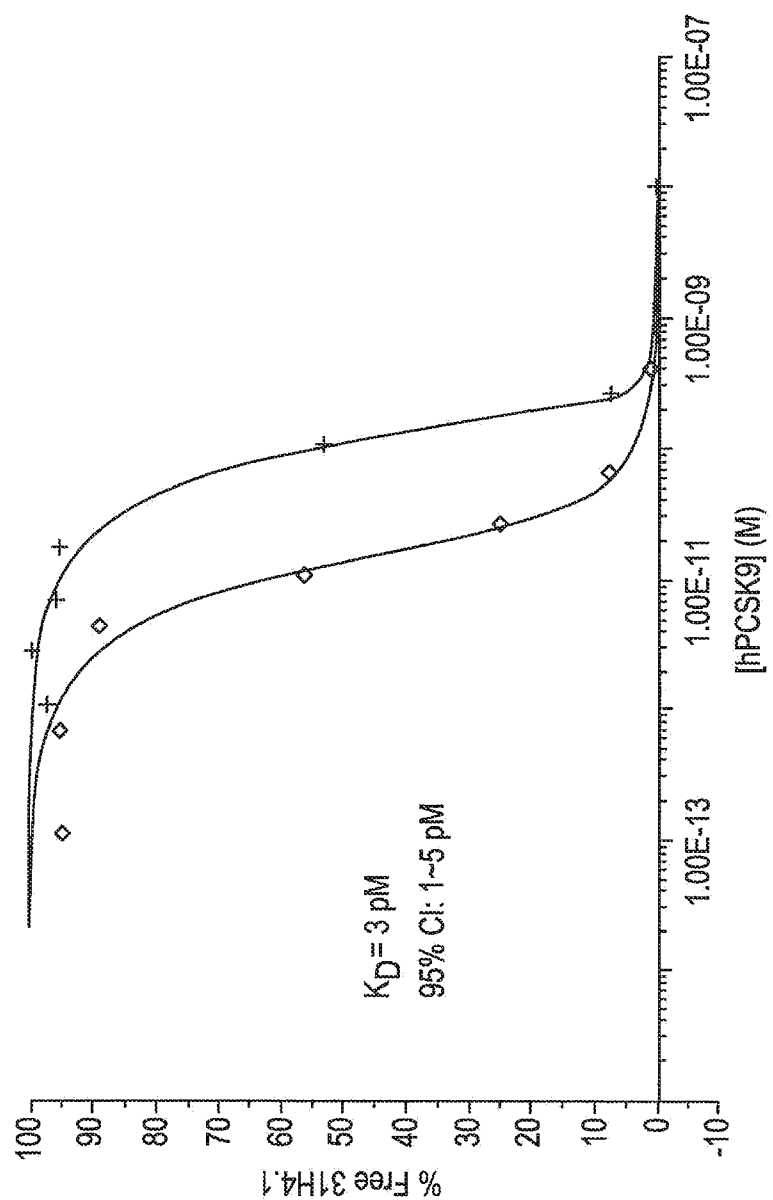
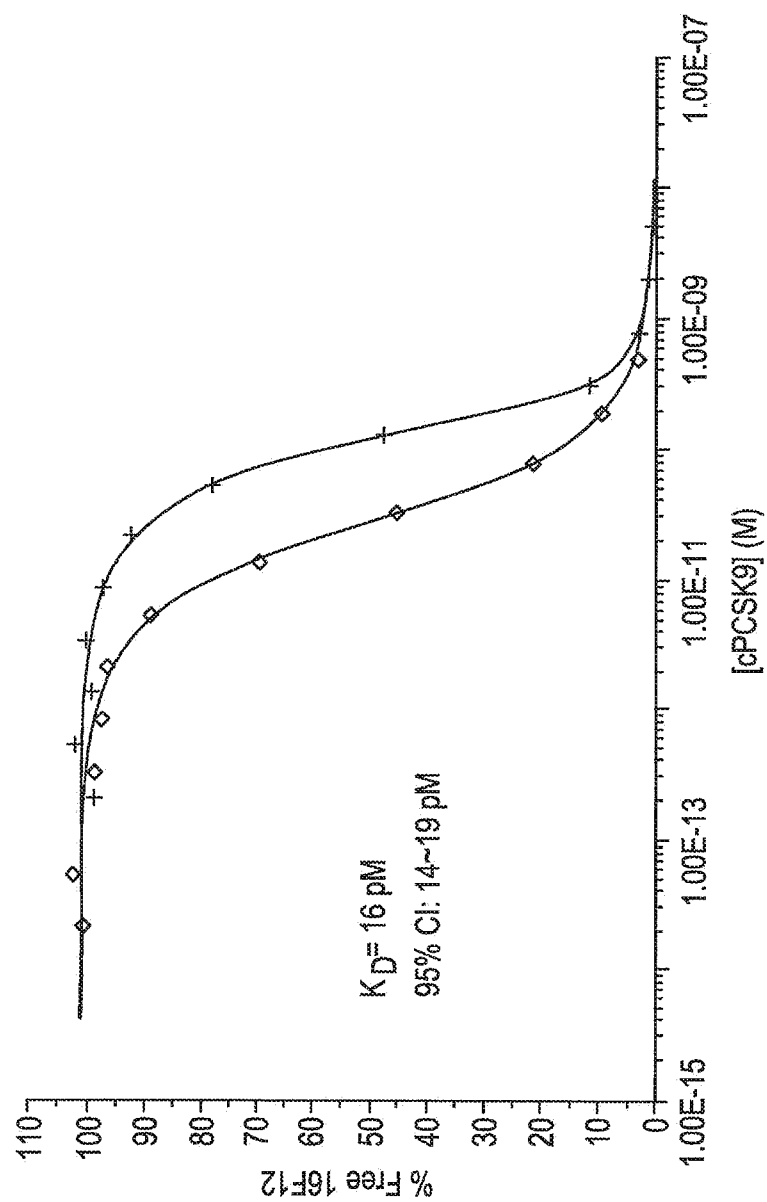


FIG. 4C

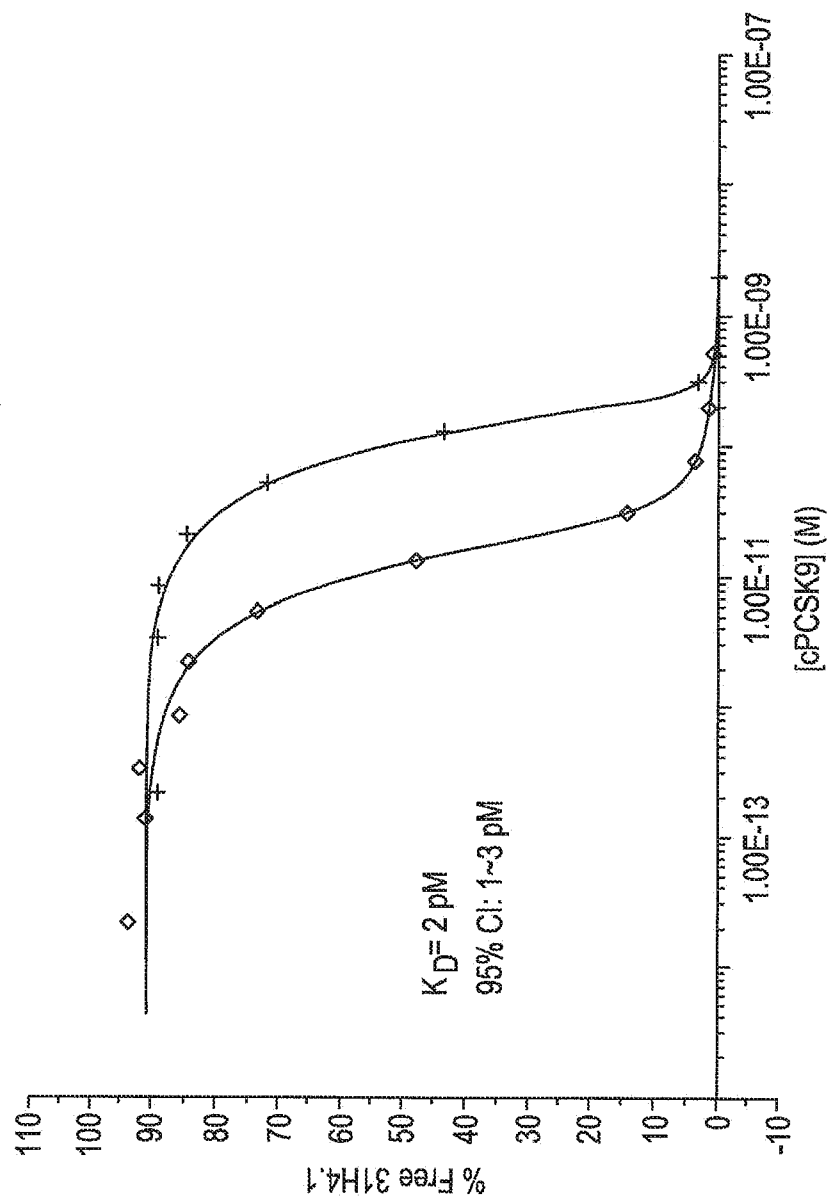
10 or 100pM 16F12 + (0.05pM ~ 5nM) cPCSK9



Jeffrey

FIG. 4D

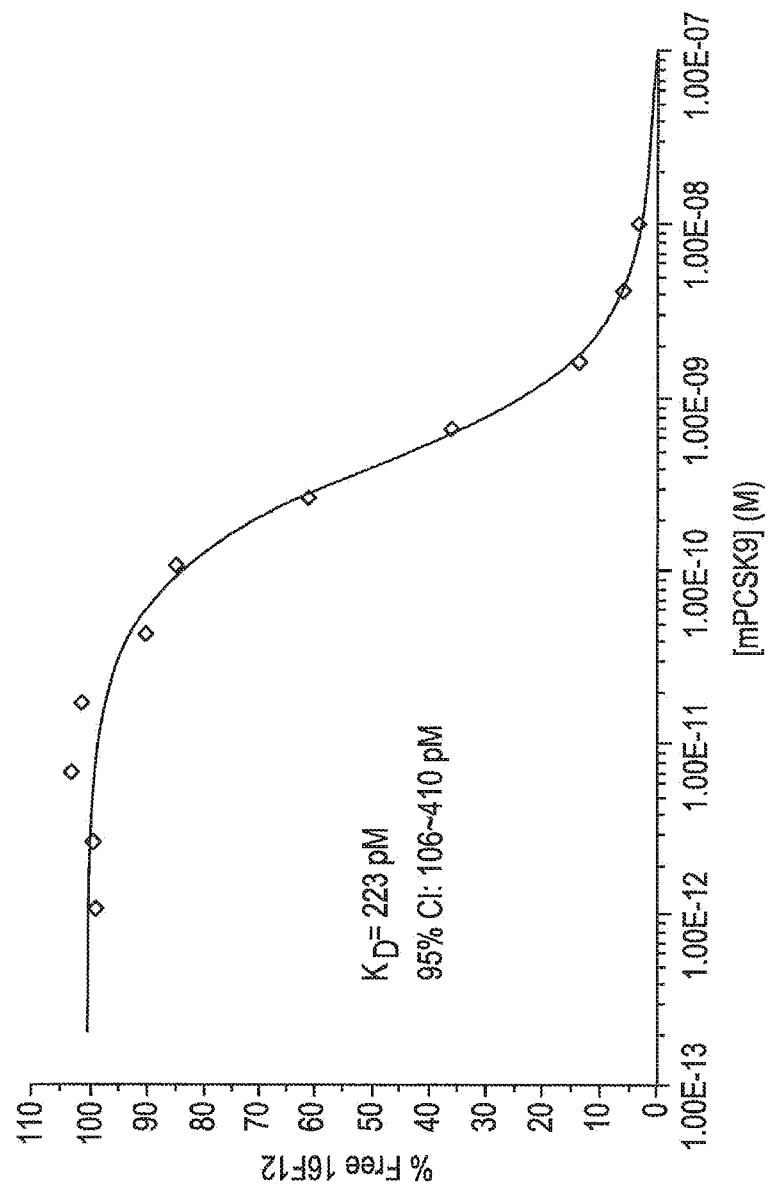
10 or 100pM 31H4 + (0.05pM ~ 5nM) cPCSK9



Leight

FIG. 4E

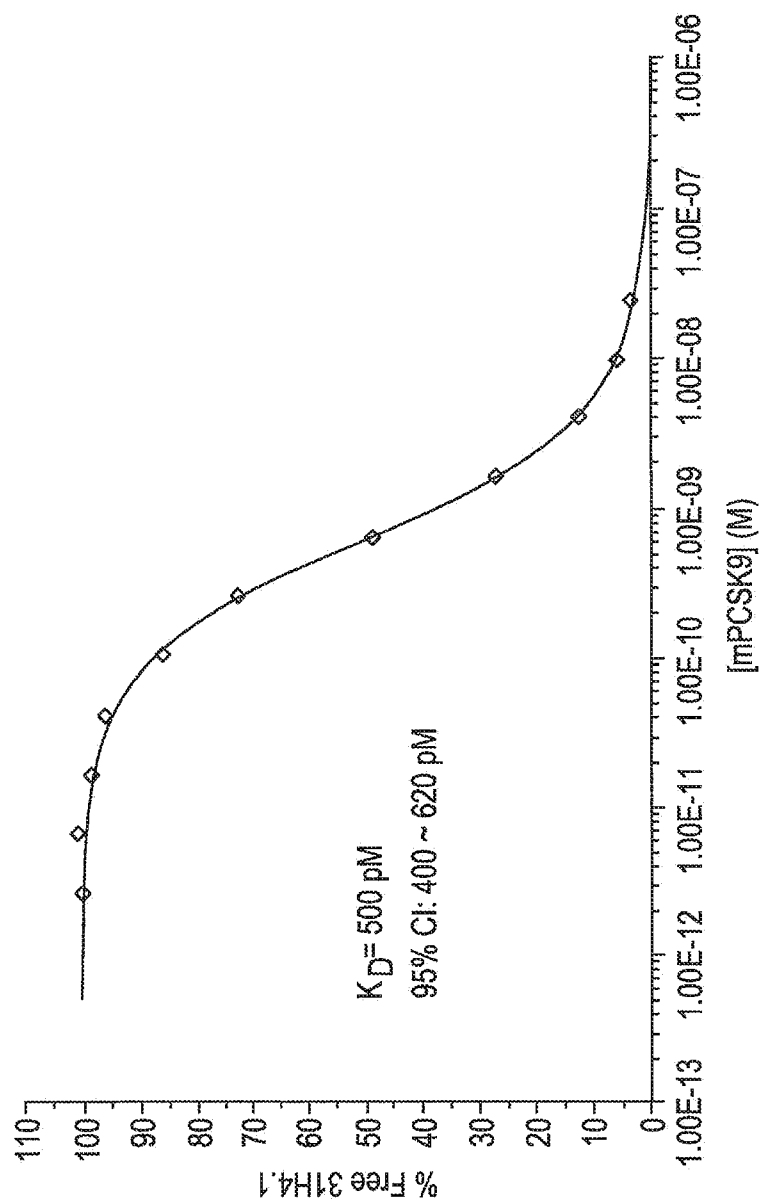
100pM 16F12 + (1pM ~ 10nM) mPCSK9



Lipshitz

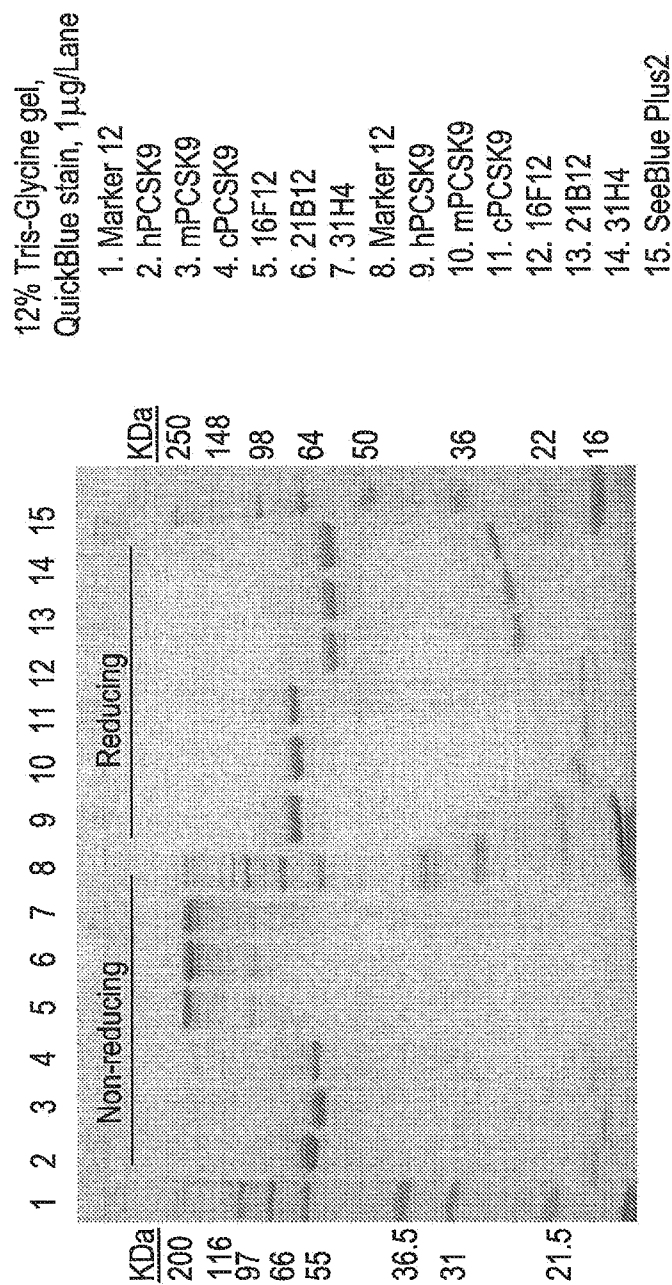
FIG. 4F

100pM 31H4 + (2.6pM ~ 25nM) mPCSK9



Leptin

FIG. 5A



Leptin

FIG. 5B

0.1/0.3/1/3nM hPCSK9 + (1pM ~ 25nM) 21B12

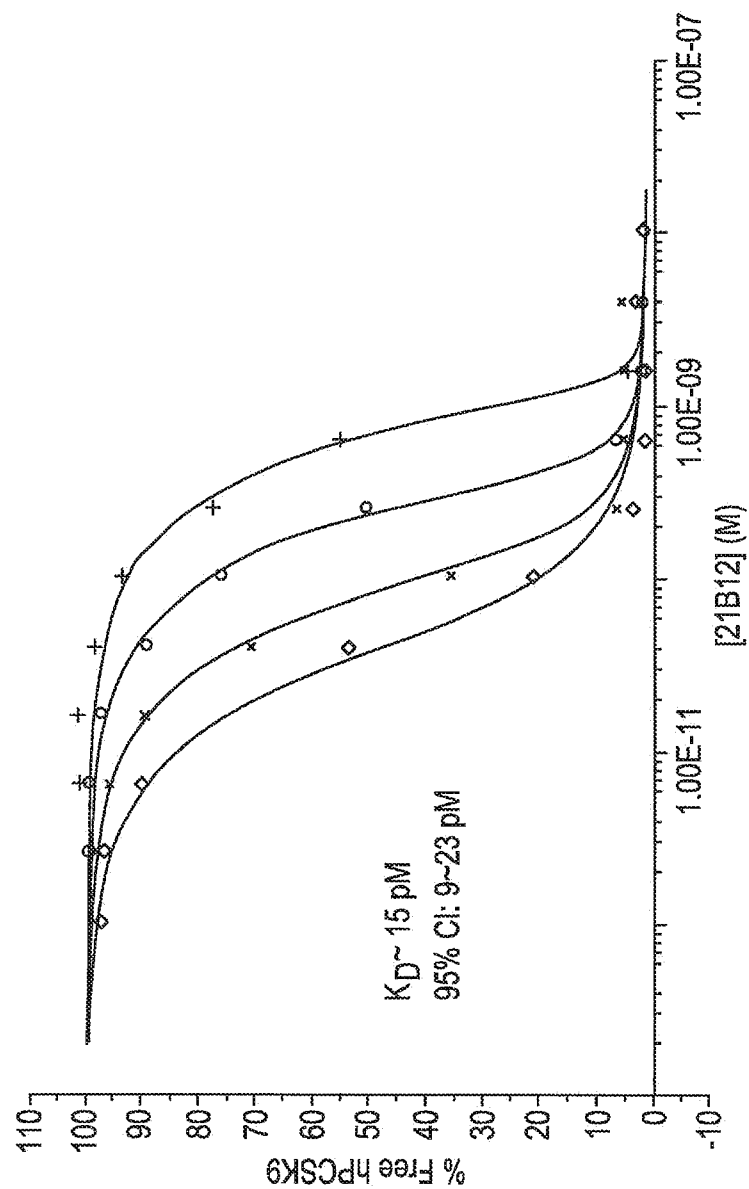


FIG. 5C

0.1/0.3/1/3nM cPCK9 + (1pM ~ 25nM) 21B12

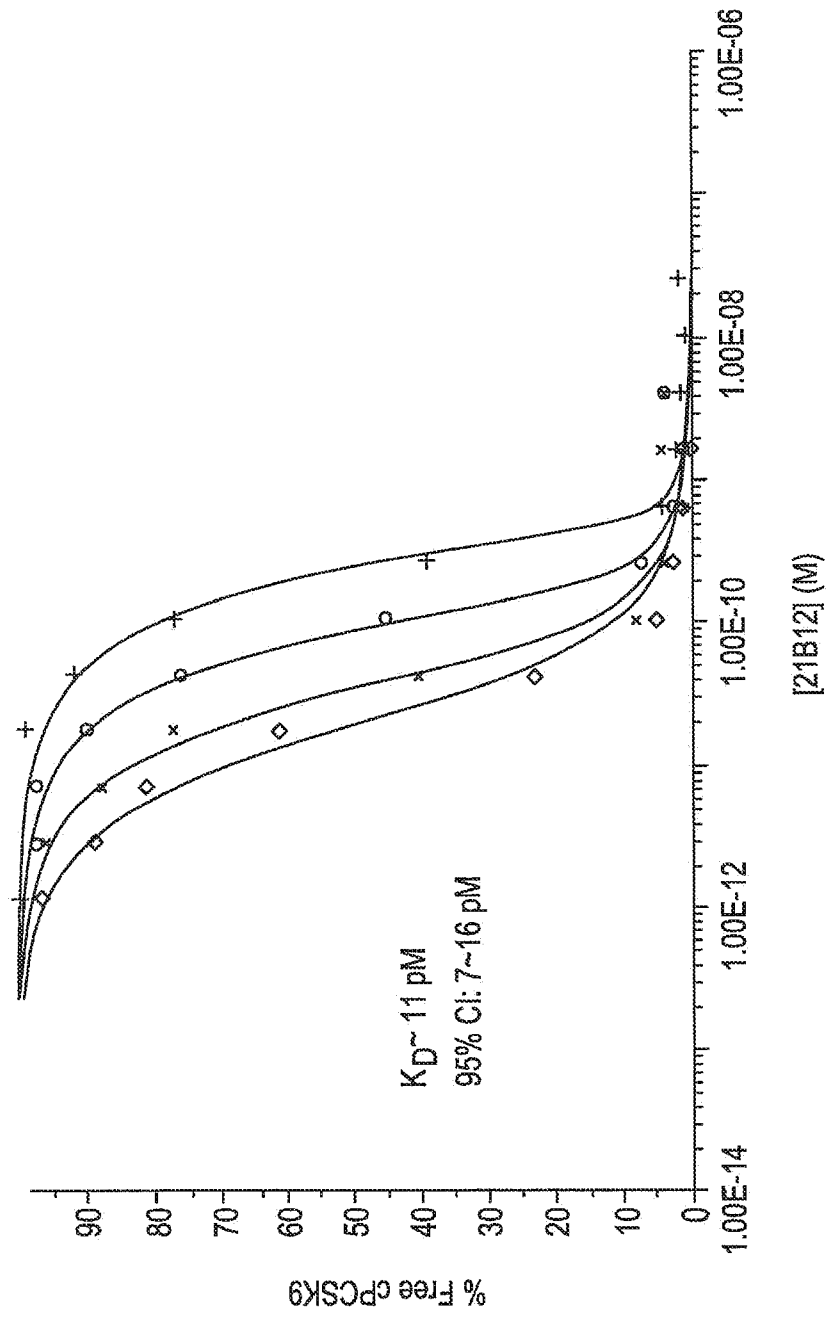
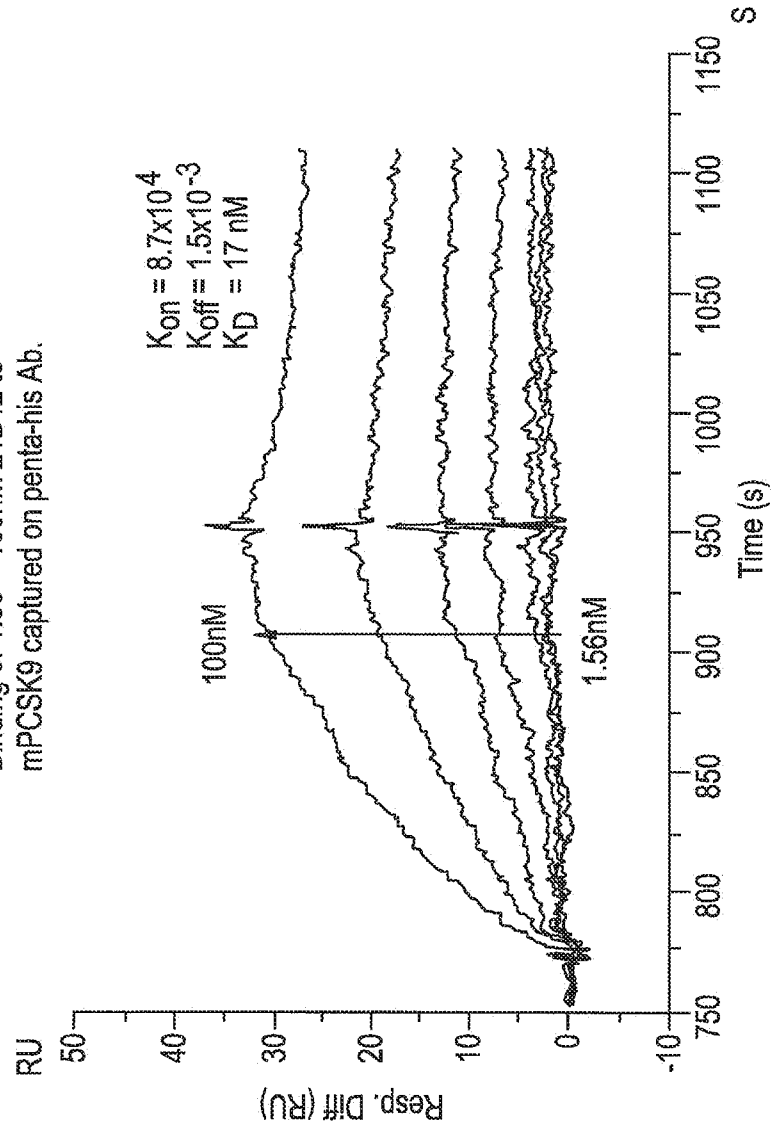


FIG. 5D

Binding of 1.56 ~ 100nM 21B12 to
mPCSK9 captured on penta-his Ab.



Flippin

FIG. 5E

Epitope Binning of anti-PCSK9 Abs on hPCSK9

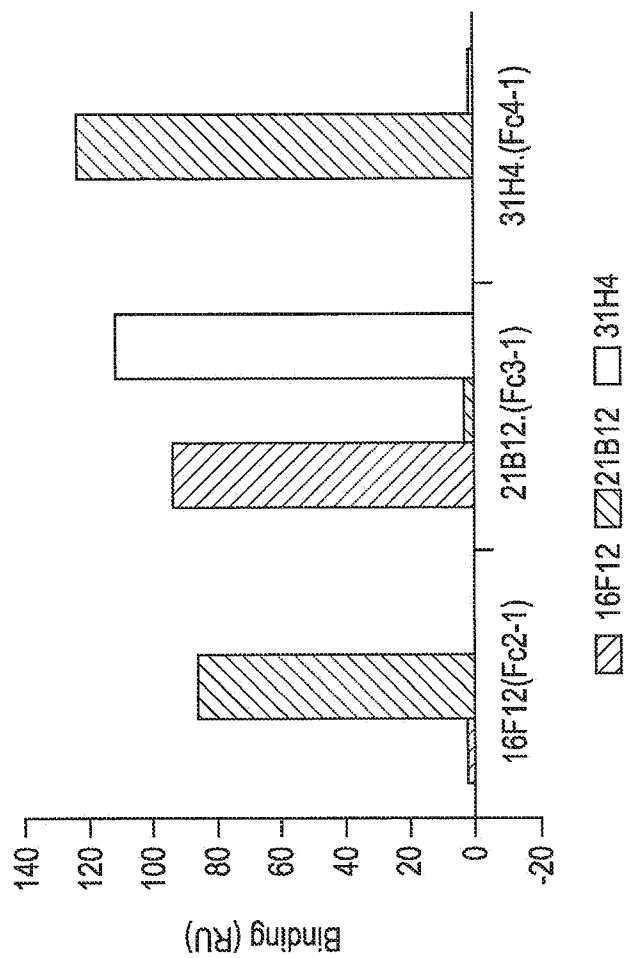
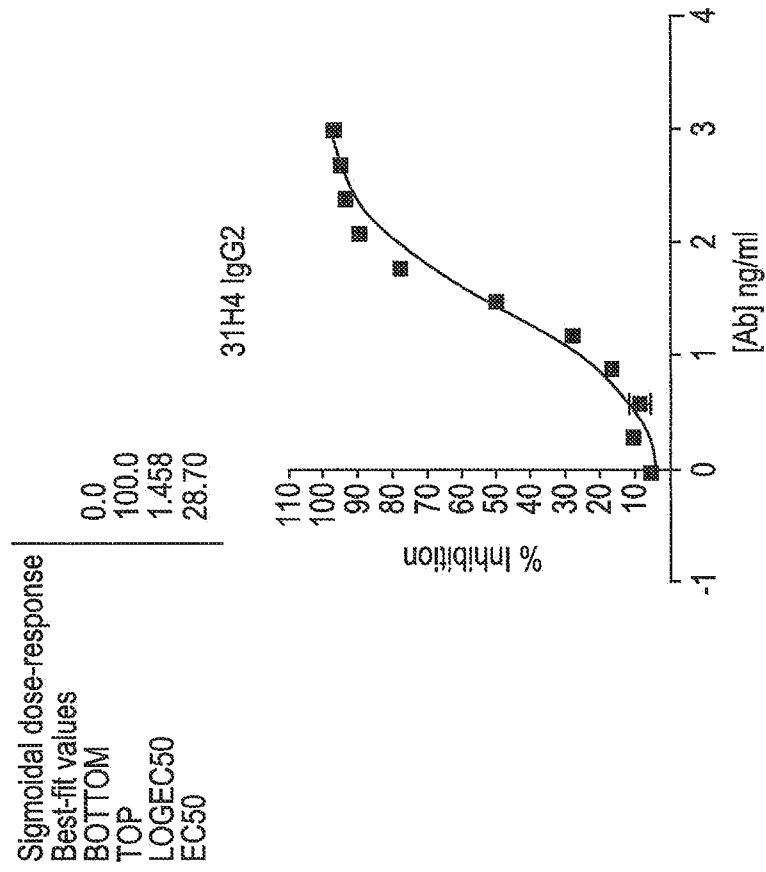
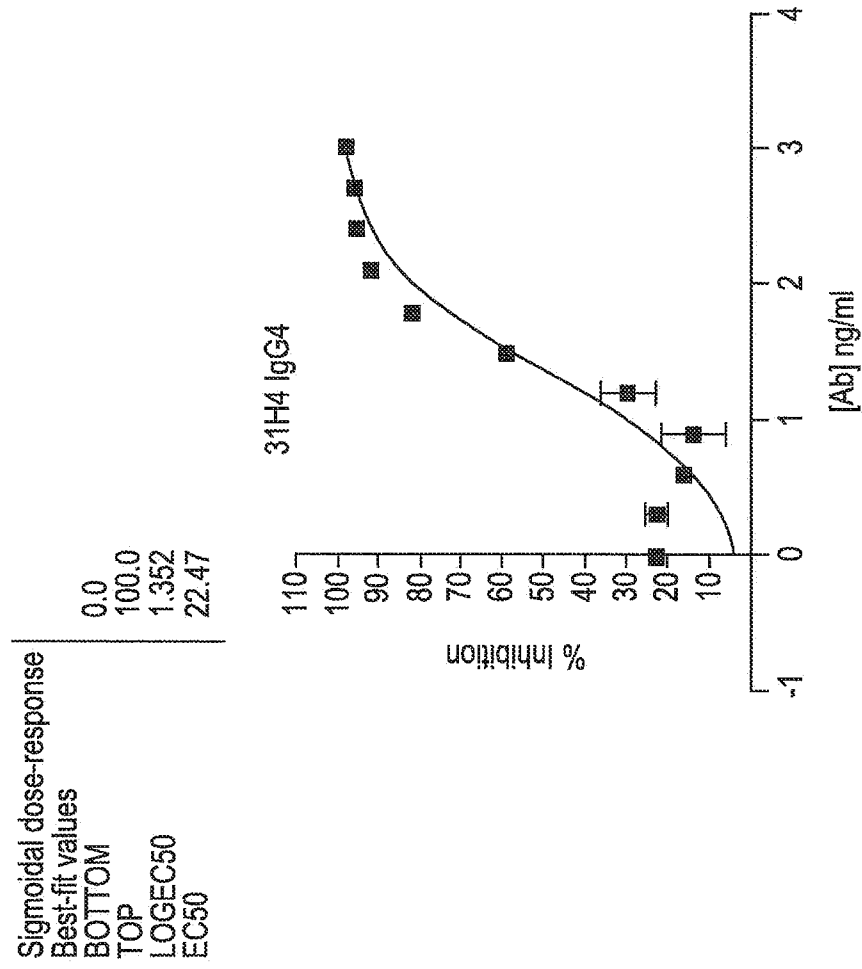


FIG. 6A



Leipziger

FIG. 6B



Fligge

FIG. 6C

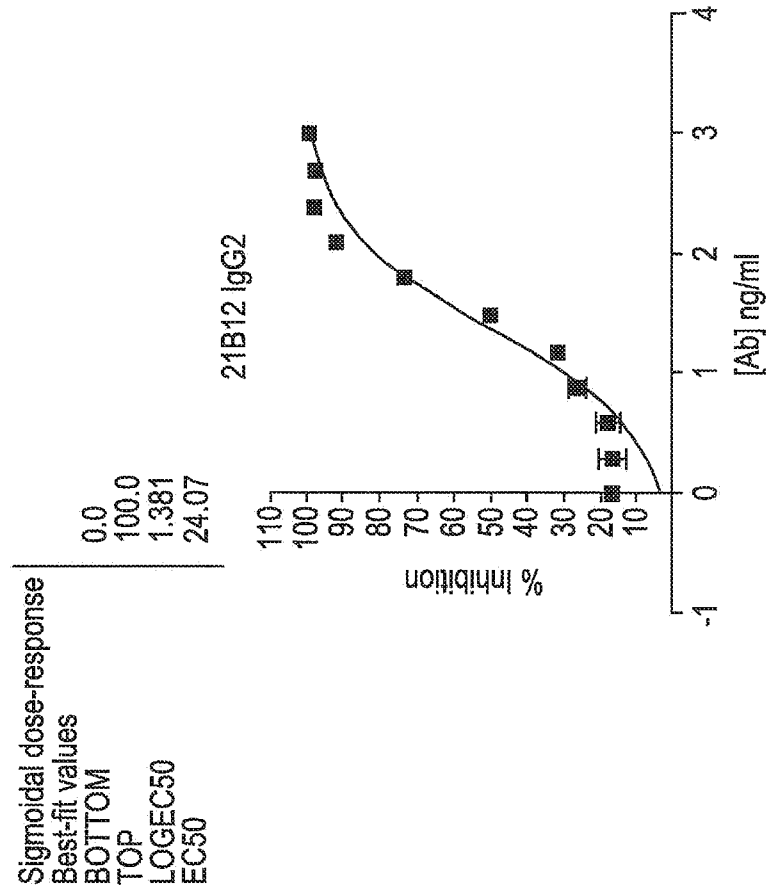
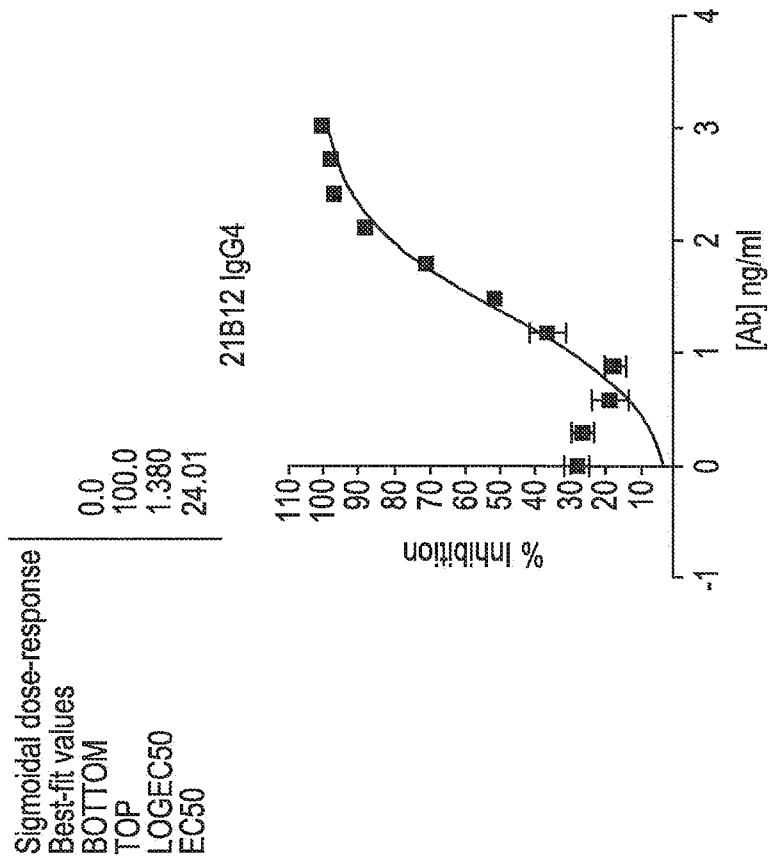


FIG. 6D



Leipziger

FIG. 7A

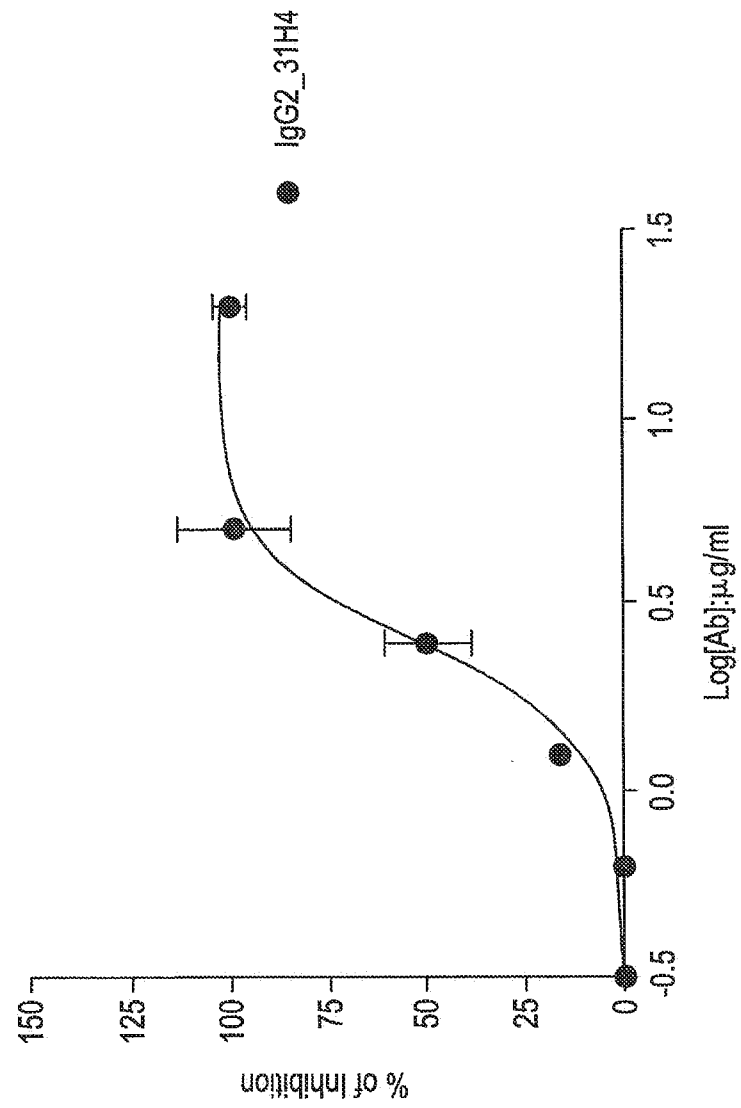


FIG. 7B

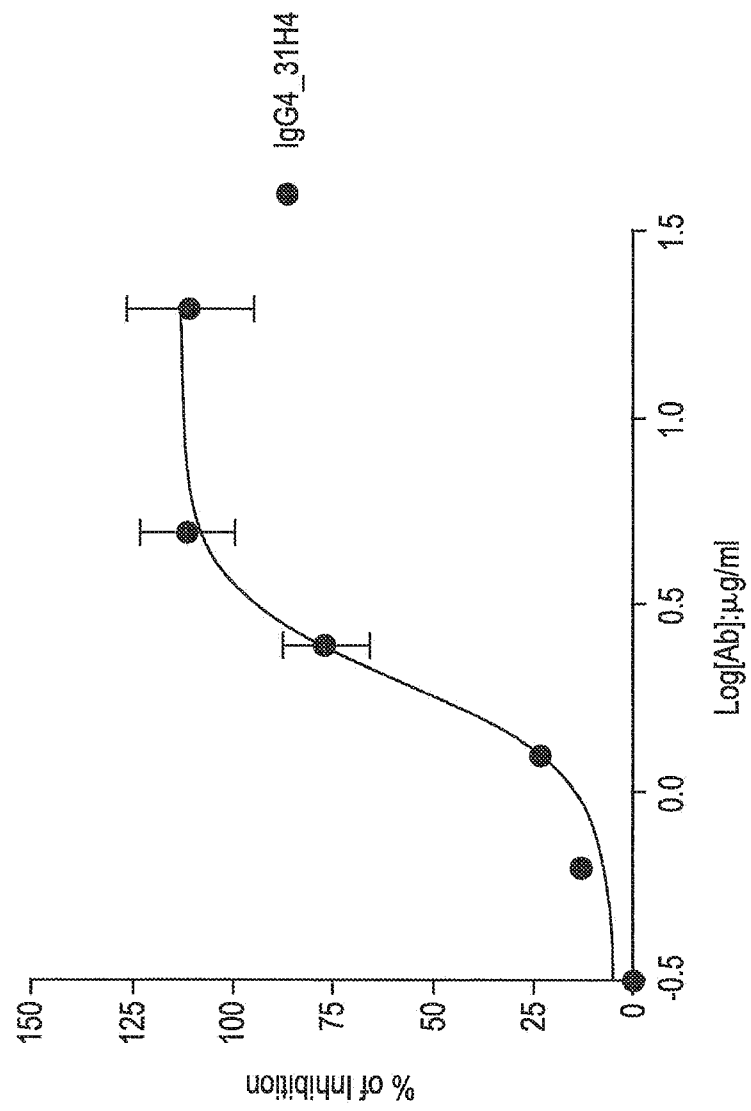


FIG. 7C

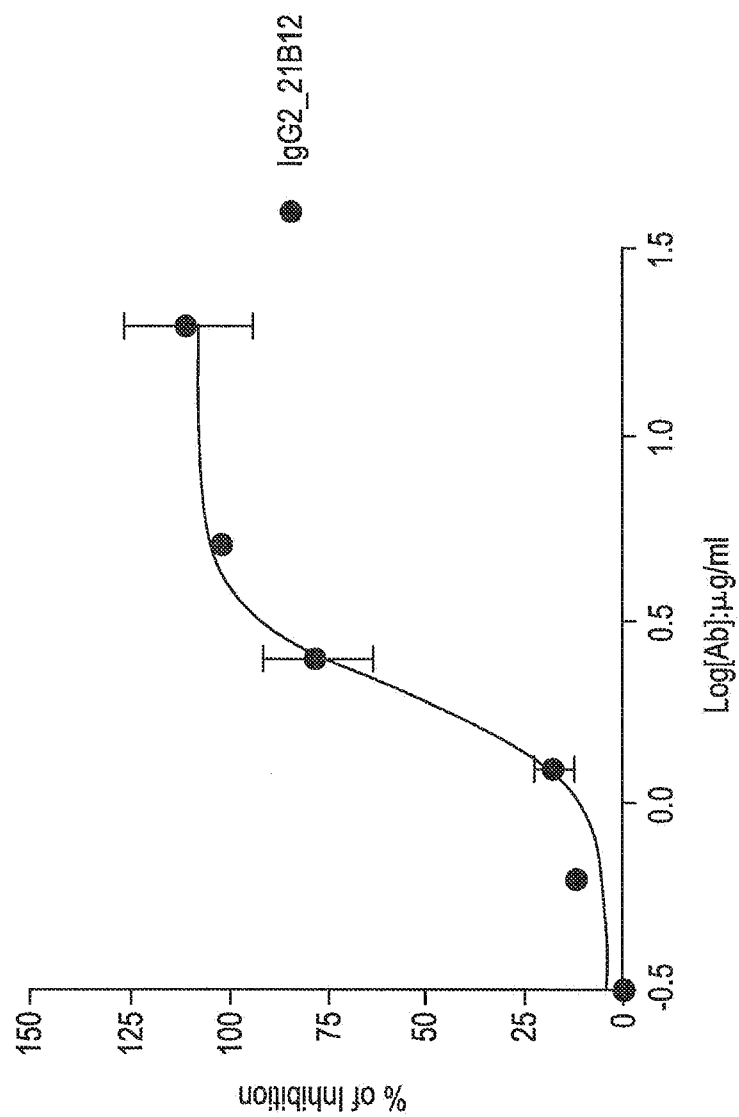
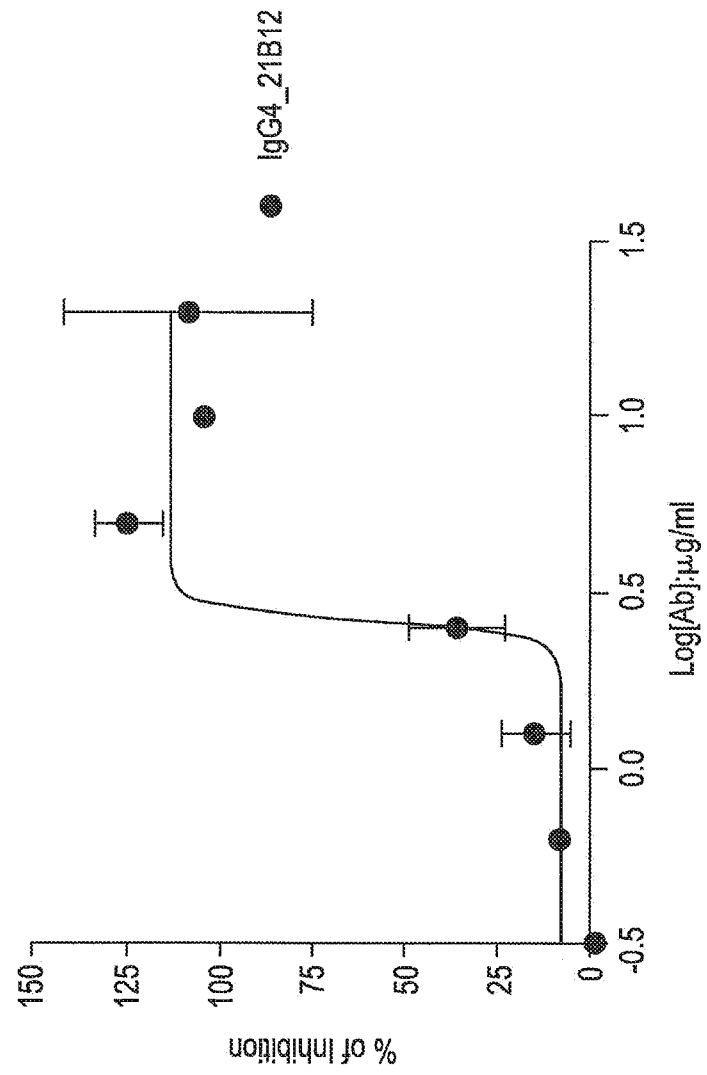


FIG. 7D



Signature

FIG. 8A

Total Cholesterol

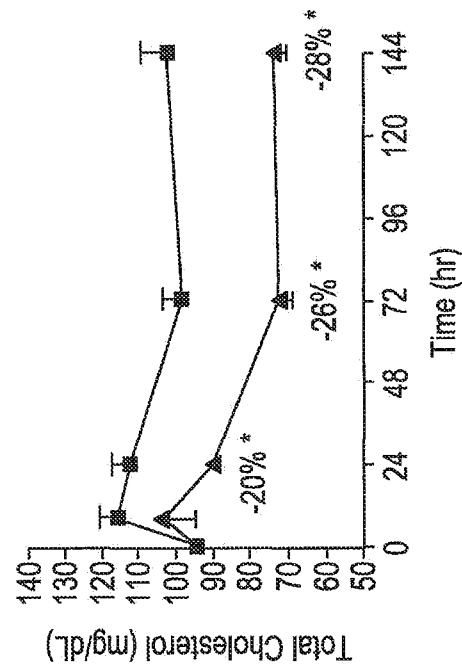
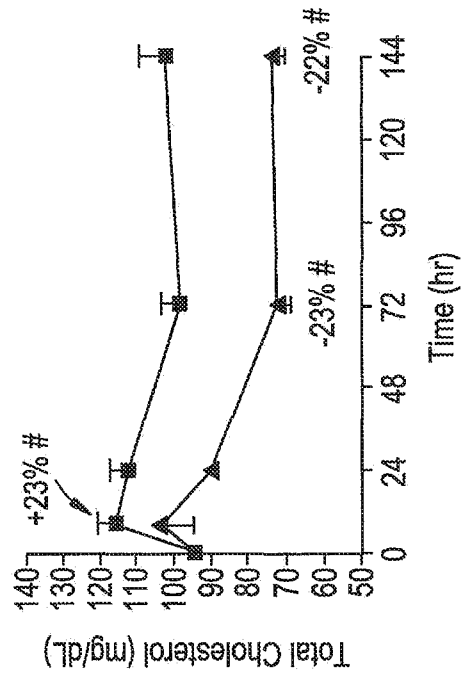


FIG. 8B

Total Cholesterol



J. E. P. Jr.

FIG. 8D

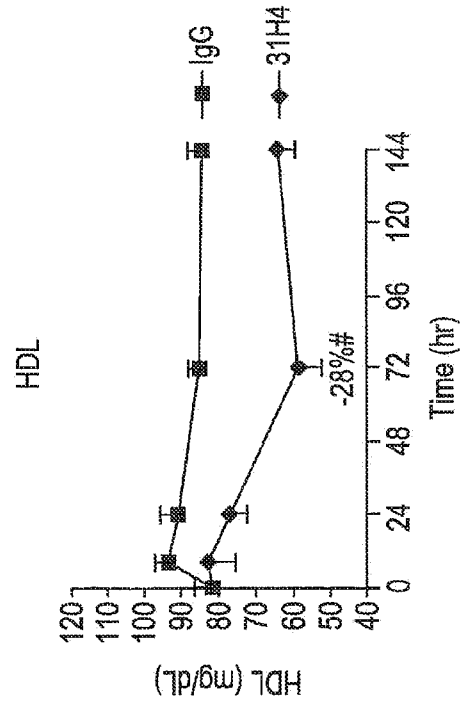


FIG. 8C

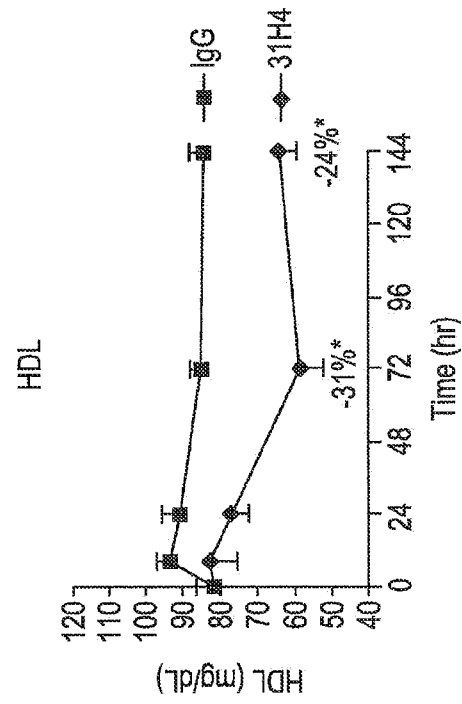


FIG. 9

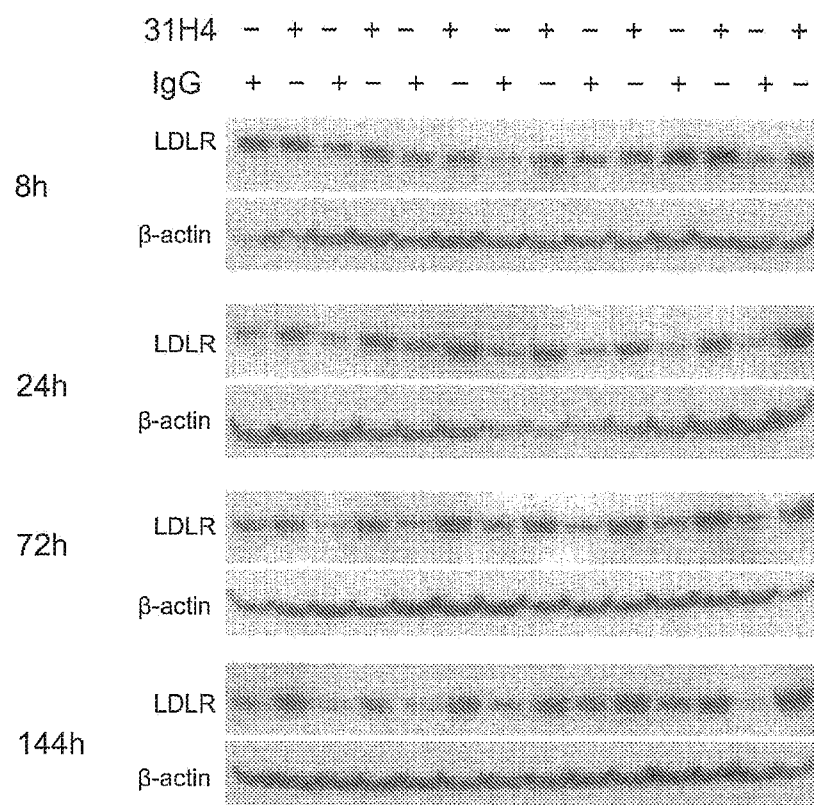


FIG. 10A
Total Cholesterol

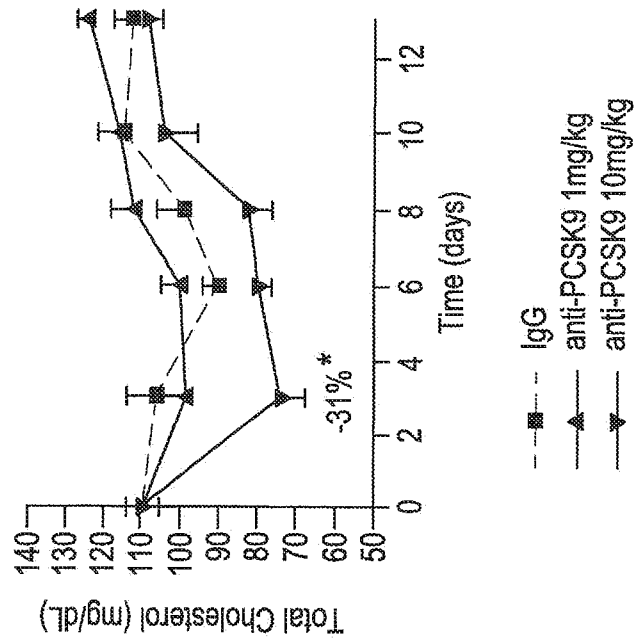
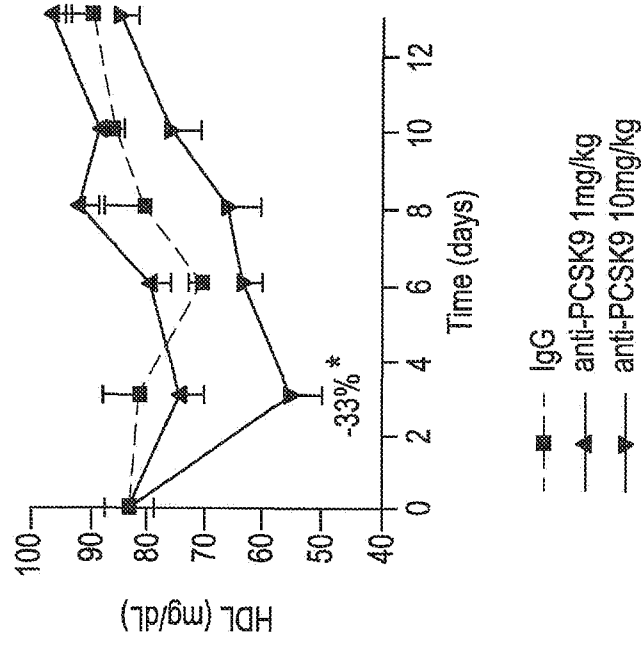
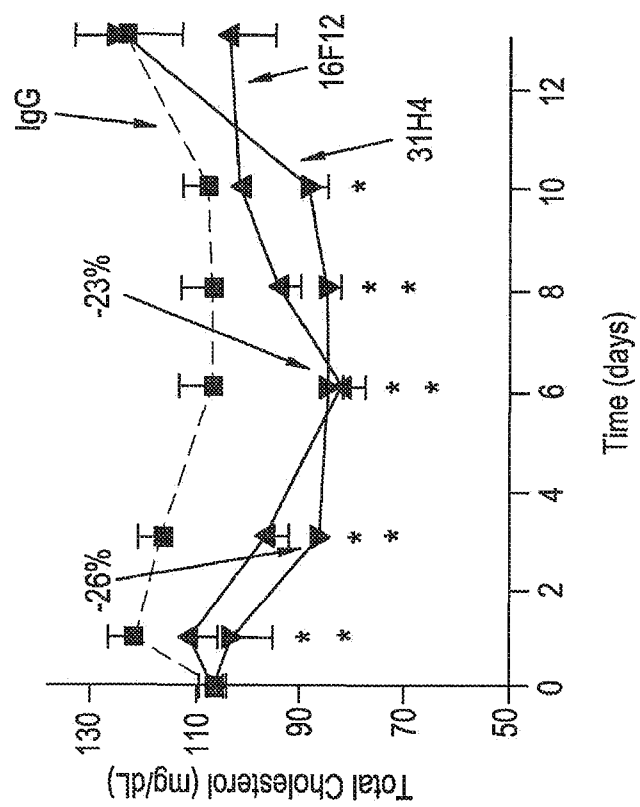


FIG. 10B
HDL



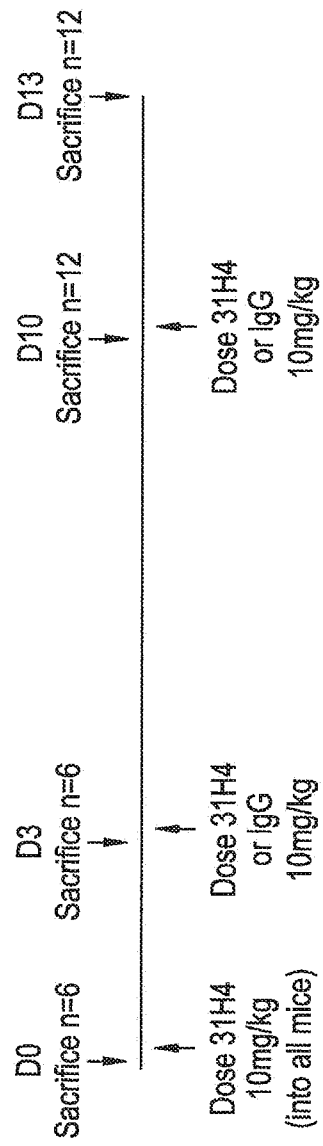
Signature

FIG. 10C



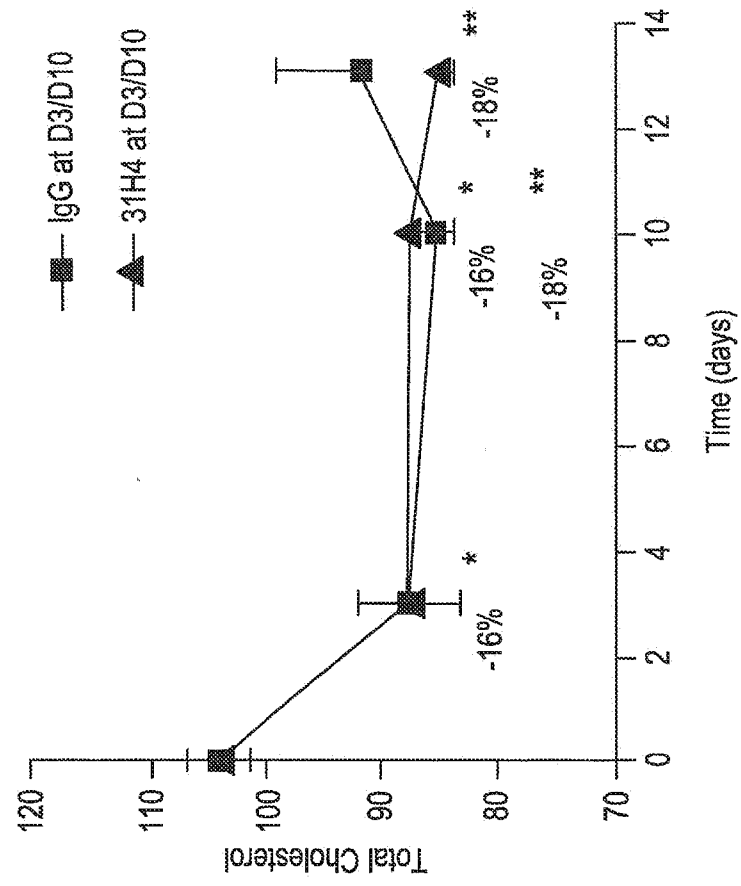
Jeffrey

FIG. 11A



Flippin

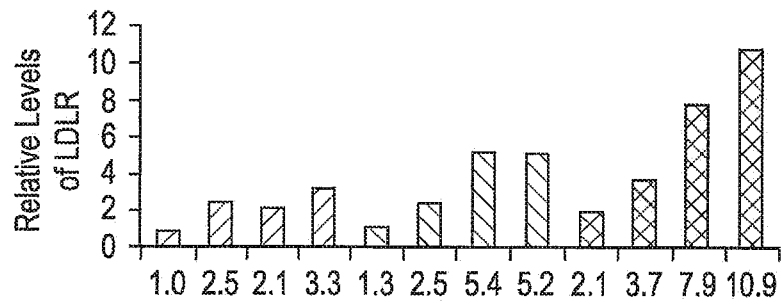
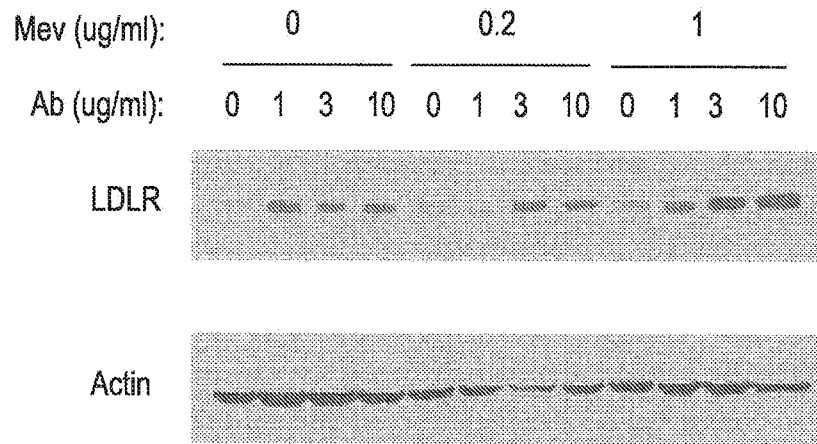
FIG. 11B



Leifert

FIG. 12A

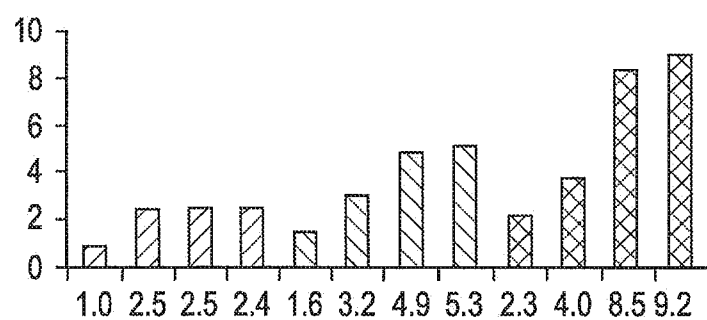
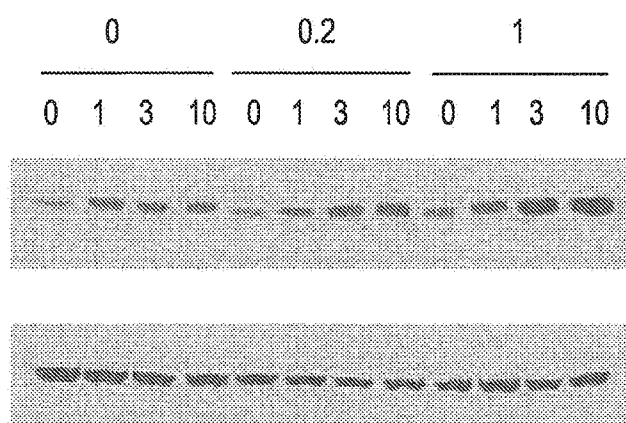
21B12



F. G. P. T.

FIG. 12B

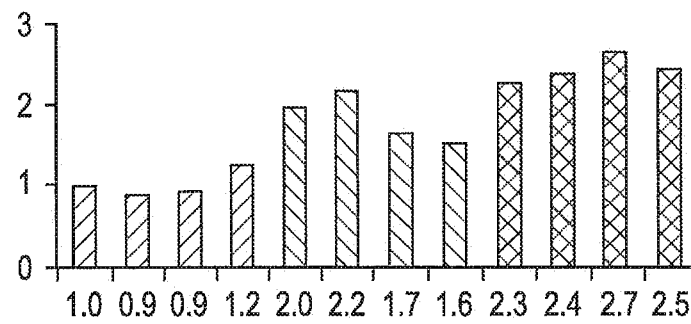
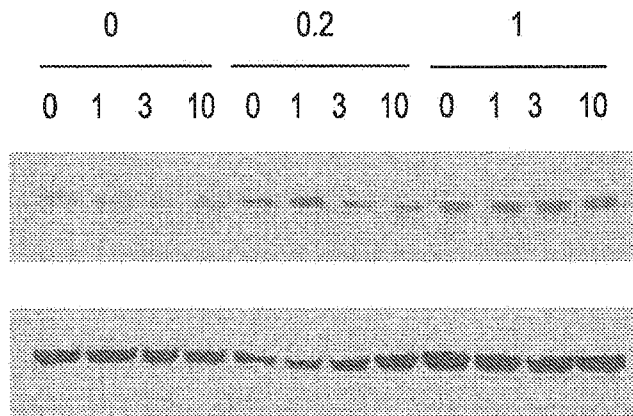
31H4



Leif R. H.

FIG. 12C

25A7.1



Le Goff

FIG. 12D

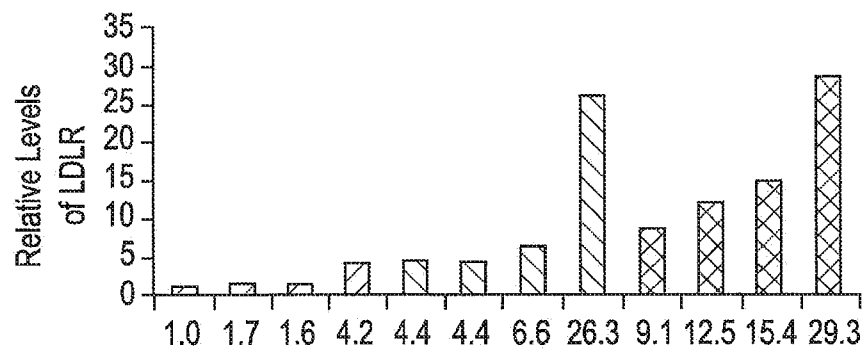
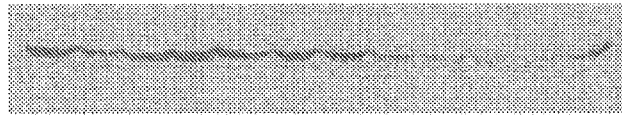
21B12

Mev (ug/ml):	0				0.2				1			
Ab (ug/ml):	0	1	3	10	0	1	3	10	0	1	3	10

LDLR



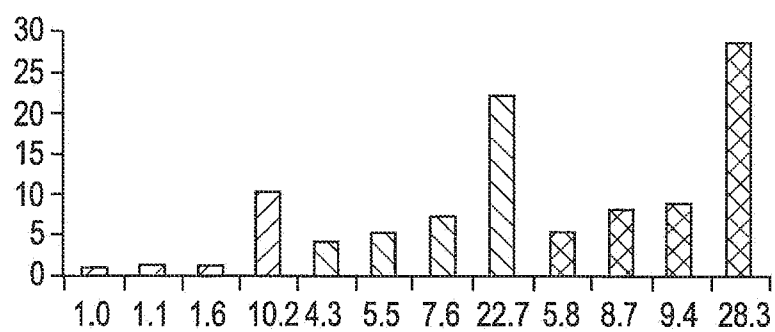
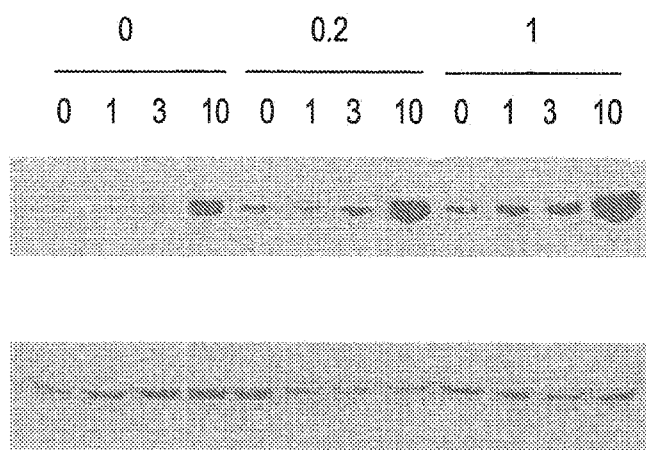
Actin



Leffler

FIG. 12E

31H4



Leppä

FIG. 12F

25A7.1

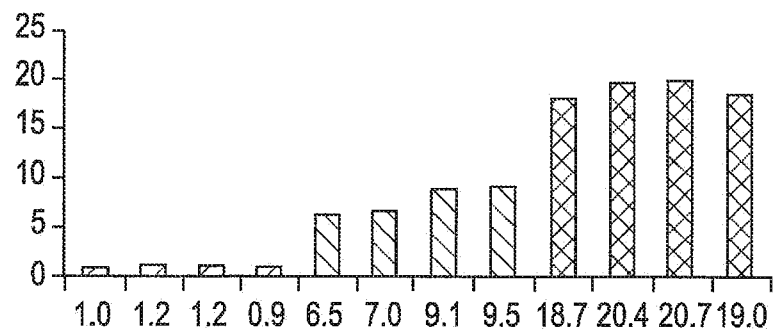
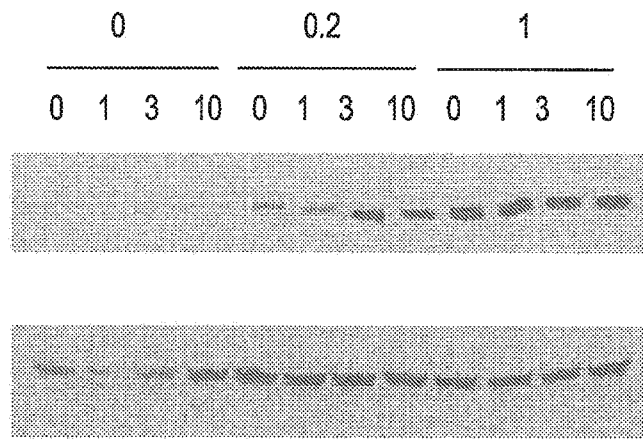
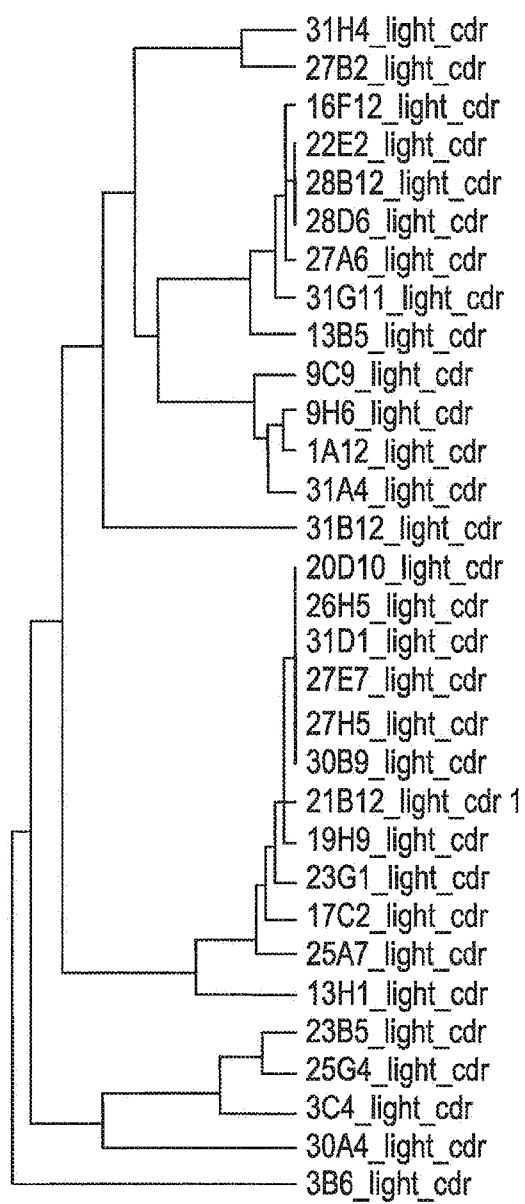


FIG. 13A

Light Chain:

23B5_light_cdr	RAQSI.....SSVLN	(SEQ ID NO:209)	AASLQ	(SEQ ID NO:211)	QQSYSSPIT~~~~~	(SEQ ID NO:213)
25G4_light_cdr	RAQSI.....SIVLN	(SEQ ID NO:388)	AASLQ	(SEQ ID NO:393)	QQSYSPIT~~~~~	(SEQ ID NO:394)
3C4_light_cdr	RAQRI.....SNVL	(SEQ ID NO:219)	AASLQ	(SEQ ID NO:211)	QQSYSPIT~~~~~	(SEQ ID NO:235)
30A4_light_cdr	RSQSLHNGNGFLN	(SEQ ID NO:220)	LGSHRAS	(SEQ ID NO:227)	MQVLPFT~~~~~	(SEQ ID NO:236)
21B12_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	NSYTSMSV~~~~~	(SEQ ID NO:395)
23G1_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSMSV~~~~~	(SEQ ID NO:164)
20D10_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSMSV~~~~~	(SEQ ID NO:164)
26H5_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSMSV~~~~~	(SEQ ID NO:164)
31D1_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSMSV~~~~~	(SEQ ID NO:164)
27E7_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSMSV~~~~~	(SEQ ID NO:164)
27H5_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSMSV~~~~~	(SEQ ID NO:164)
30B9_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:158)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSMSV~~~~~	(SEQ ID NO:164)
19H9_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:389)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSMSV~~~~~	(SEQ ID NO:164)
17C2_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:390)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSMSV~~~~~	(SEQ ID NO:164)
25A7_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:391)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:162)	SSYTSMSV~~~~~	(SEQ ID NO:396)
13H1_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:221)	EVSNRPS	(SEQ ID NO:228)	CSYAGSTLV~~~~~	(SEQ ID NO:237)
31H4_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:222)	GNSNRPS	(SEQ ID NO:229)	QSYDSSLSGSV~~~~~	(SEQ ID NO:238)
27B2_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:223)	GNTYRPS	(SEQ ID NO:230)	QSYDSSLSGSV~~~~~	(SEQ ID NO:239)
9H6_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:197)	SNNRPS	(SEQ ID NO:199)	AAWDDSLN.WV~~~~~	(SEQ ID NO:397)
1A12_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:381)	SNNRPS	(SEQ ID NO:199)	AAWDDSLN.WV~~~~~	(SEQ ID NO:397)
9C9_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:381)	SNNRPS	(SEQ ID NO:392)	AAWDDSLN.WV~~~~~	(SEQ ID NO:397)
31A4_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:197)	SNNRPS	(SEQ ID NO:231)	AAWDDSLN.WV~~~~~	(SEQ ID NO:240)
22E2_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:182)	DYNKRPS	(SEQ ID NO:183)	GTWDSLSGSV~~~~~	(SEQ ID NO:185)
28B12_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:182)	DYNKRPS	(SEQ ID NO:183)	GTWDSLSGSV~~~~~	(SEQ ID NO:185)
28D6_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:182)	DYNKRPS	(SEQ ID NO:183)	GTWDSLSGSV~~~~~	(SEQ ID NO:185)
16F12_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:182)	DYNKRPS	(SEQ ID NO:183)	GTWDSLSGSV~~~~~	(SEQ ID NO:185)
27A6_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:182)	DYNKRPS	(SEQ ID NO:183)	GTWDSLSGSV~~~~~	(SEQ ID NO:185)
31G11_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:182)	DYNKRPS	(SEQ ID NO:183)	GTWDSLSGSV~~~~~	(SEQ ID NO:185)
13B5_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:224)	DANKRPS	(SEQ ID NO:232)	GTWDSLSGSV~~~~~	(SEQ ID NO:399)
31B12_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:225)	QNTKPL	(SEQ ID NO:233)	GTWDSLSGSV~~~~~	(SEQ ID NO:241)
3B6_light_cdr	~TGTSSDVGGINSVS	(SEQ ID NO:226)	VDIGGIV	(SEQ ID NO:234)	GTWDSLSGSV~~~~~	(SEQ ID NO:242)
Consensus	~TGTSSDVGGINSVS				SDYHCGADHGSGINFWV	(SEQ ID NO:243)

FIG. 13B



10.00
substitutions per 100 residues

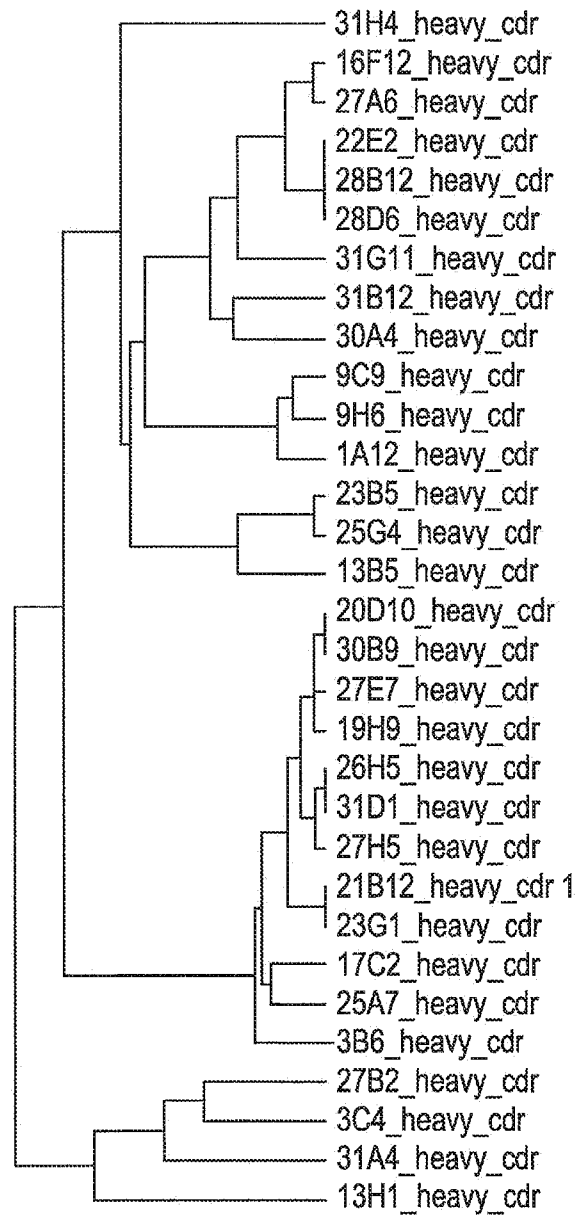
Leif

FIG. 13C

Heavy Chain:

20D10_heavy_cdr	WISAYNG.NNNYAKRVQG	(SEQ ID NO:174)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
30B9_heavy_cdr	WISAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:174)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
27E7_heavy_cdr	WISAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:174)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
19H9_heavy_cdr	WISAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:174)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
21B12_heavy_cdr	WVSFNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:175)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
23G1_heavy_cdr	WVSFNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:175)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
26H5_heavy_cdr	WVSFNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:174)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
31D1_heavy_cdr	WVSFNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:174)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
27H5_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:178)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
17C2_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
25A7_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
3B6_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
9C9_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
9H6_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
1A12_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
23B5_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
25G4_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
13B5_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
22E2_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
28B12_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
28D6_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
16F12_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
27A6_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
31G11_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
30A4_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
31B12_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
31H4_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
27B2_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
3C4_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
31A4_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
13H1_heavy_cdr	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:179)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)
Consensus	WVSAYNG.NNN AQRVQG	(SEQ ID NO:174)	GYGMDV~~~~~(SEQ ID NO:180)

FIG. 13D



10.00
substitutions per 100 residues

FIG. 13E

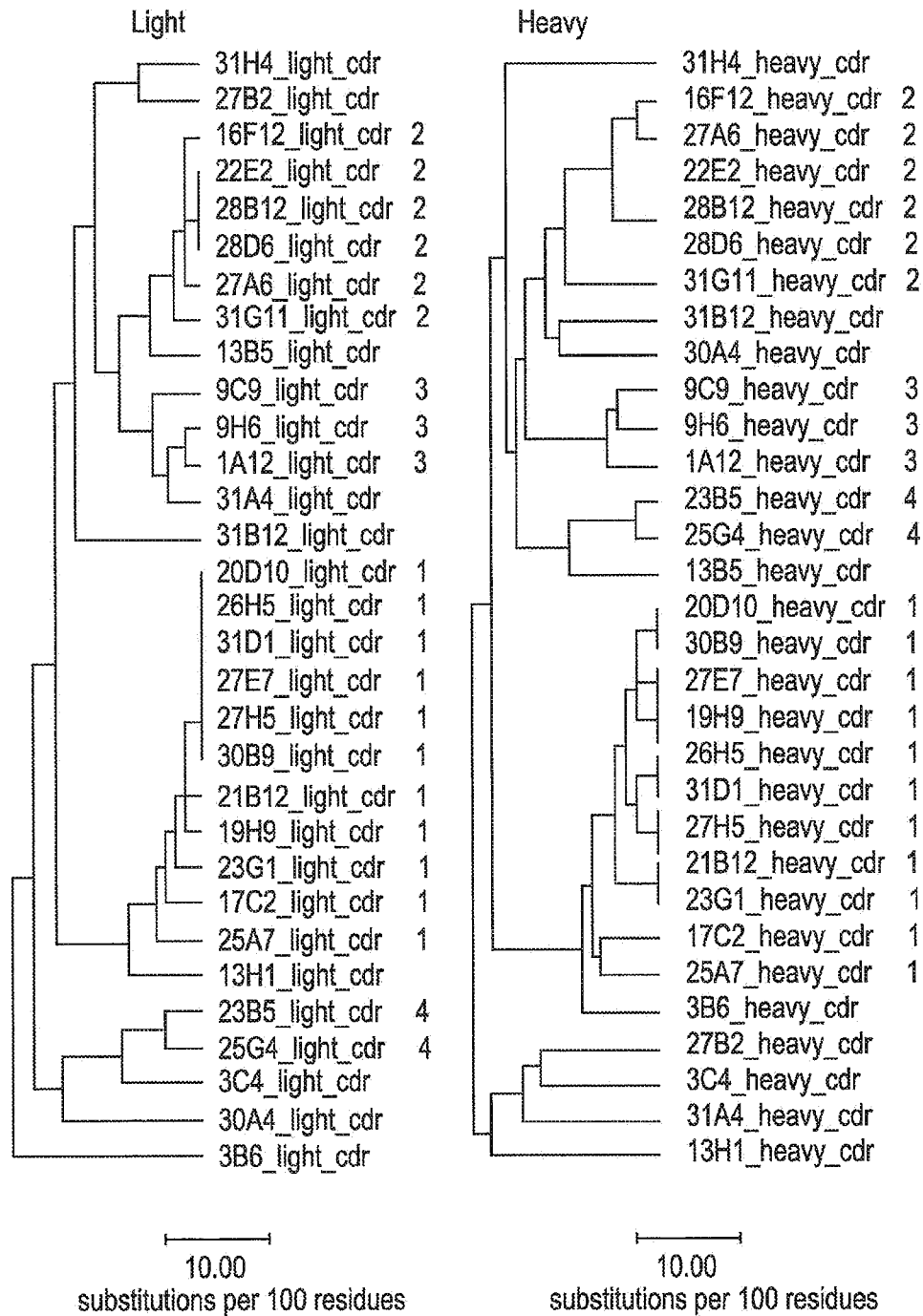


FIG. 13F

Consensus for Group 1:

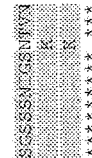
20D10_light_heavy_cdr	IGTSGDVGERTSRVQ	(SEQ ID NO:150)	ENKRRS	(SEQ ID NO:162)	SEYTSNNG	(SEQ ID NO:164)
30B9_light_heavy_cdr	S G	(SEQ ID NO:150)	S	(SEQ ID NO:162)	S TSM	(SEQ ID NO:164)
27E7_light_heavy_cdr	S G	(SEQ ID NO:150)	S	(SEQ ID NO:162)	S TSM	(SEQ ID NO:164)
19H9_light_heavy_cdr	N G	(SEQ ID NO:150)	S	(SEQ ID NO:162)	S TSM	(SEQ ID NO:164)
21A12_light_heavy_cdr	S G	(SEQ ID NO:150)	S	(SEQ ID NO:162)	N TSM	(SEQ ID NO:165)
23G1_light_heavy_cdr	S G	(SEQ ID NO:150)	I L	(SEQ ID NO:163)	N TSM	(SEQ ID NO:165)
26H5_light_heavy_cdr	S G	(SEQ ID NO:150)	S	(SEQ ID NO:162)	S TSM	(SEQ ID NO:164)
31D1_light_heavy_cdr	S G	(SEQ ID NO:150)	S	(SEQ ID NO:162)	S TSM	(SEQ ID NO:164)
27H5_light_heavy_cdr	S G	(SEQ ID NO:150)	S	(SEQ ID NO:162)	S TSM	(SEQ ID NO:164)
17C2_light_heavy_cdr	S A	(SEQ ID NO:160)	S	(SEQ ID NO:162)	S TSM	(SEQ ID NO:164)
25A7_light_heavy_cdr	S R	(SEQ ID NO:161)	S	(SEQ ID NO:162)	S TSM	(SEQ ID NO:166)
	*** **** *		***		***	
20D10_light_heavy_cdr	GPVTSYELIS	(SEQ ID NO:165)	WISAINMNTNMYRQKQ	(SEQ ID NO:174)	GYGMPV	(SEQ ID NO:180)
30B9_light_heavy_cdr	PIE	(SEQ ID NO:165)	I A Q V	(SEQ ID NO:174)	G	(SEQ ID NO:180)
27E7_light_heavy_cdr	SLT	(SEQ ID NO:165)	I A Q V	(SEQ ID NO:174)	G	(SEQ ID NO:180)
19H9_light_heavy_cdr	ALT	(SEQ ID NO:170)	I A Q V	(SEQ ID NO:174)	G	(SEQ ID NO:180)
21A12_light_heavy_cdr	TLT	(SEQ ID NO:171)	V F Q L	(SEQ ID NO:175)	G	(SEQ ID NO:180)
23G1_light_heavy_cdr	TLT	(SEQ ID NO:171)	V F Q L	(SEQ ID NO:175)	G	(SEQ ID NO:180)
26H5_light_heavy_cdr	TLT	(SEQ ID NO:171)	I F Q V	(SEQ ID NO:176)	G	(SEQ ID NO:180)
31D1_light_heavy_cdr	TLT	(SEQ ID NO:171)	I F Q V	(SEQ ID NO:176)	G	(SEQ ID NO:180)
27H5_light_heavy_cdr	TLT	(SEQ ID NO:171)	I V Q V	(SEQ ID NO:177)	G	(SEQ ID NO:180)
17C2_light_heavy_cdr	SFL	(SEQ ID NO:172)	V A Q F	(SEQ ID NO:178)	V	(SEQ ID NO:181)
25A7_light_heavy_cdr	TFP	(SEQ ID NO:173)	I A E L	(SEQ ID NO:179)	V	(SEQ ID NO:181)
	**		***		**	

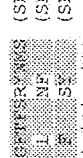
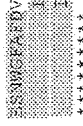
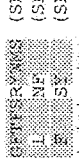
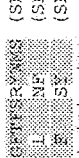
Consensus for Group 2:

22E2_light_heavy_cdr	SGSSSN/CNRRMS	(SEQ ID NO:182)	DYKRRPS	(SEQ ID NO:183)	GTWDSLSG	(SEQ ID NO:185)
28B12_light_heavy_cdr		(SEQ ID NO:182)	Y	(SEQ ID NO:183)	G	(SEQ ID NO:185)
28P6_light_heavy_cdr		(SEQ ID NO:182)	Y	(SEQ ID NO:183)	G	(SEQ ID NO:185)
16F12_light_heavy_cdr		(SEQ ID NO:182)	Y	(SEQ ID NO:183)	A	(SEQ ID NO:186)
27A6_light_heavy_cdr		(SEQ ID NO:182)	Y	(SEQ ID NO:183)	S	(SEQ ID NO:187)
31G11_light_heavy_cdr		(SEQ ID NO:182)	S	(SEQ ID NO:184)	A	(SEQ ID NO:188)
	*****		*		*****	
22E2_light_heavy_cdr	GPVTSYELIS	(SEQ ID NO:188)	LIINDSSNRYADSSKRG	(SEQ ID NO:191)	RIIALXYVYGWQ	(SEQ ID NO:195)
28B12_light_heavy_cdr	SIF	(SEQ ID NO:188)	N NR A	(SEQ ID NO:191)	A AL	(SEQ ID NO:195)
28P6_light_heavy_cdr	SIF	(SEQ ID NO:188)	N NR A	(SEQ ID NO:191)	A AL	(SEQ ID NO:195)
16F12_light_heavy_cdr	NF	(SEQ ID NO:189)	S DE A	(SEQ ID NO:192)	A AL	(SEQ ID NO:195)
27A6_light_heavy_cdr	NF	(SEQ ID NO:188)	S DK A	(SEQ ID NO:193)	A AL	(SEQ ID NO:195)
31G11_light_heavy_cdr	RY	(SEQ ID NO:190)	H NT V	(SEQ ID NO:194)	G VA	(SEQ ID NO:196)
	**** *		***		**	

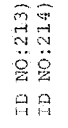
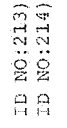
FIG. 13G

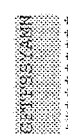
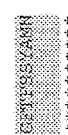
Consensus for Group 3:

9H6_light_heavy_cdr (SEQ ID NO:197)  (SEQ ID NO:199)  (SEQ ID NO:201)
 1A12_light_heavy_cdr (SEQ ID NO:198)  (SEQ ID NO:200) 
 9C9_light_heavy_cdr (SEQ ID NO:198)  (SEQ ID NO:200) 

 9H6_light_heavy_cdr (SEQ ID NO:202)  (SEQ ID NO:205) 
 1A12_light_heavy_cdr (SEQ ID NO:203)  (SEQ ID NO:206) 
 9C9_light_heavy_cdr (SEQ ID NO:204)  (SEQ ID NO:206) 

Consensus for Group 4:

23B5_light_heavy_cdr (SEQ ID NO:209)  (SEQ ID NO:211) 
 25G4_light_heavy_cdr (SEQ ID NO:210)  (SEQ ID NO:212) 

 23B5_light_heavy_cdr (SEQ ID NO:215)  (SEQ ID NO:216) 
 25G4_light_heavy_cdr (SEQ ID NO:215)  (SEQ ID NO:217) 

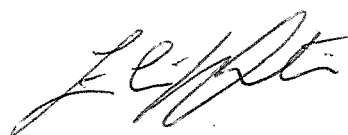


FIG. 13H

Group 1 (11 members)										
LV_CDR1										
	SEQ	LV_CDR2	SEQ	LV_CDR3	SEQ	H_CDR1	SEQ	H_CDR2	SEQ	H_CDR3
	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:
1										58
CONSENSUS	TGTSSDVGGSNSVS	305 EVSNRPS	306 SSYTSTSMV	307 SYGIS	308 WISAYNGNTNYAQKVQG	309 GYGMGV	310			
25A7	R.....	311	312 S.V.	313	308	314 ..V...	315			
17C2	A.....	316	312	317	308 ..V.....	318 ..V...	315			
21B12		305	312 N.....	319	308 ..V.F.....	320	310			
23G1		305 ..F.....	321 N.....	319	308 ..V.F.....	320	310			
19H9	N.....	322	312	307	308	309	310			
27H5		305	312	307	308 ..V.....	323	310			
26H5		305	312	307	308 ..F.....	324	310			
31D1		305	312	307	308 ..F.....	324	310			
27E7		305	312	307	308	309	310			
20D10		305	312	307	308	309	310			
30B9		305	312	307	308	309	310			
Group 2 (6 members)										
Light chain:										
LV_CDR1										
	SEQ	LV_CDR2	SEQ	LV_CDR3	SEQ					
	ID	ID	ID	ID	ID					
	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:					
1										
CONSENSUS	SGSSSNIGNNFVS	325 DYNKRPS	326 GTWDSLSGYV	327						
31G11		325 ..S.....	331	332						
28D6		325	326	327						
28R12		325	326	327						
22E2		325	326	327						
16F12		325	326	332						
27A6		325	326	337						

FIG. 13I

Group 2, continued									
Heavy chain:									
	H_CDR1	SEQ	H_CDR2	SEQ	H_CDR3	SEQ	ID	NO:	SEQ
	ID			ID					ID
CONSENSUS	SFGMH	328	LIWNDGSNKYYADSVKG	329	AIYAALYYGMDV	330		66	
31G11	.Y...	333	...H...T..V....	334	G..VA.....	335			
28D6		328		329		330			
28B12		328		329		330			
22E2		328		329		330			
16F12		328	...S...DE.....	336		330			
27A6		328	...S...D.....	338		330			

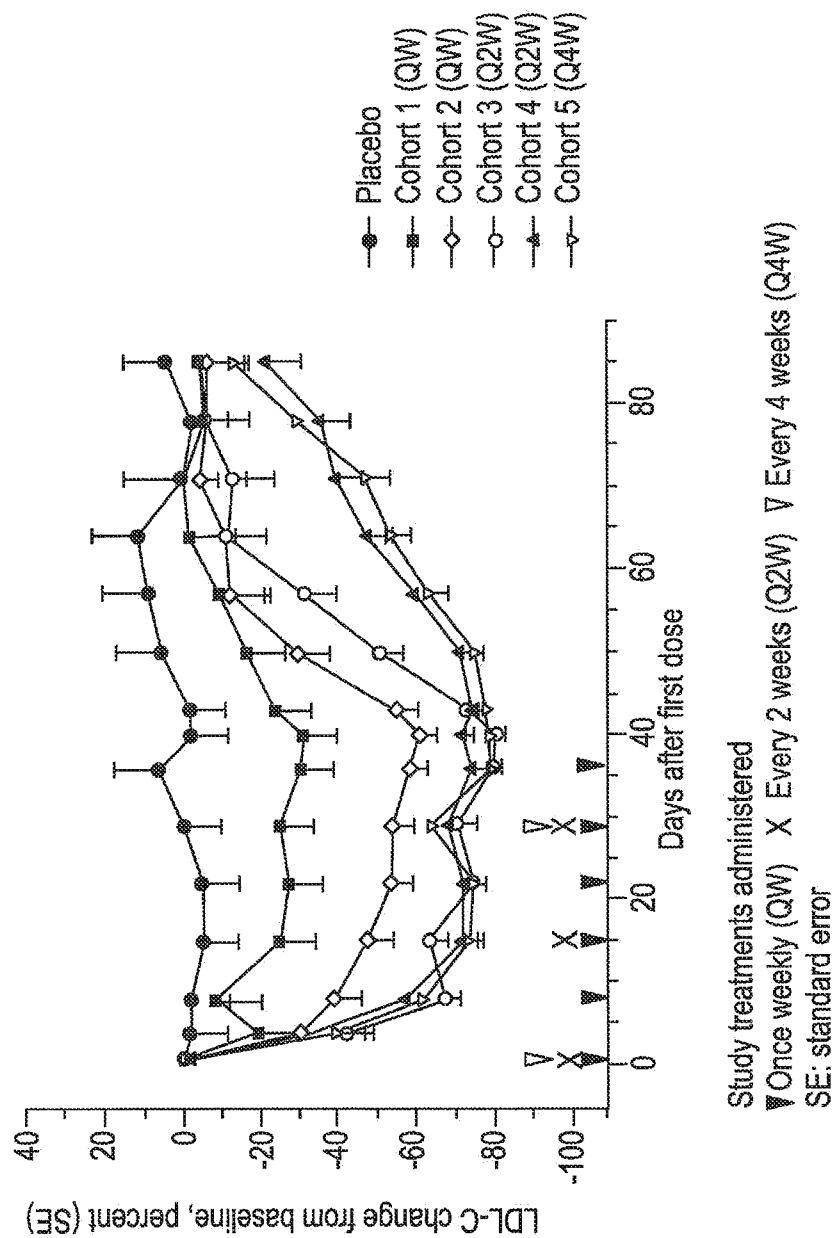
FIG. 13J

Group 3 (3 members)									
LV_CDR1									
SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ
ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:
1									62
CONSENSUS	SGSSSNIGSKTVN	339	SNRRPS	340	AAWDESENWV	341	YWMS	342	NIKQDGSEKYYVDSVKG
9H6	N...	345		340		341	R....	346	...H.....
9C9		339	R..Q..L	349		341	S...	350	
1A12		339		340		341	NF...	351	
									343
									ESNWGFAEDI
									344
									347
									V
									348
									343
									
									344
									343
									
									344

Group 4 (2 members)									
KV_CDR1									
SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ
ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:
1									
CONSENSUS	RASQSI	YLN	352	AA	SLQS	353	QOSYS	PIT	354
25G4	I...	355	..A....	356		357		A...	357
23B5	S...	358	..S....	359		360		S...	360

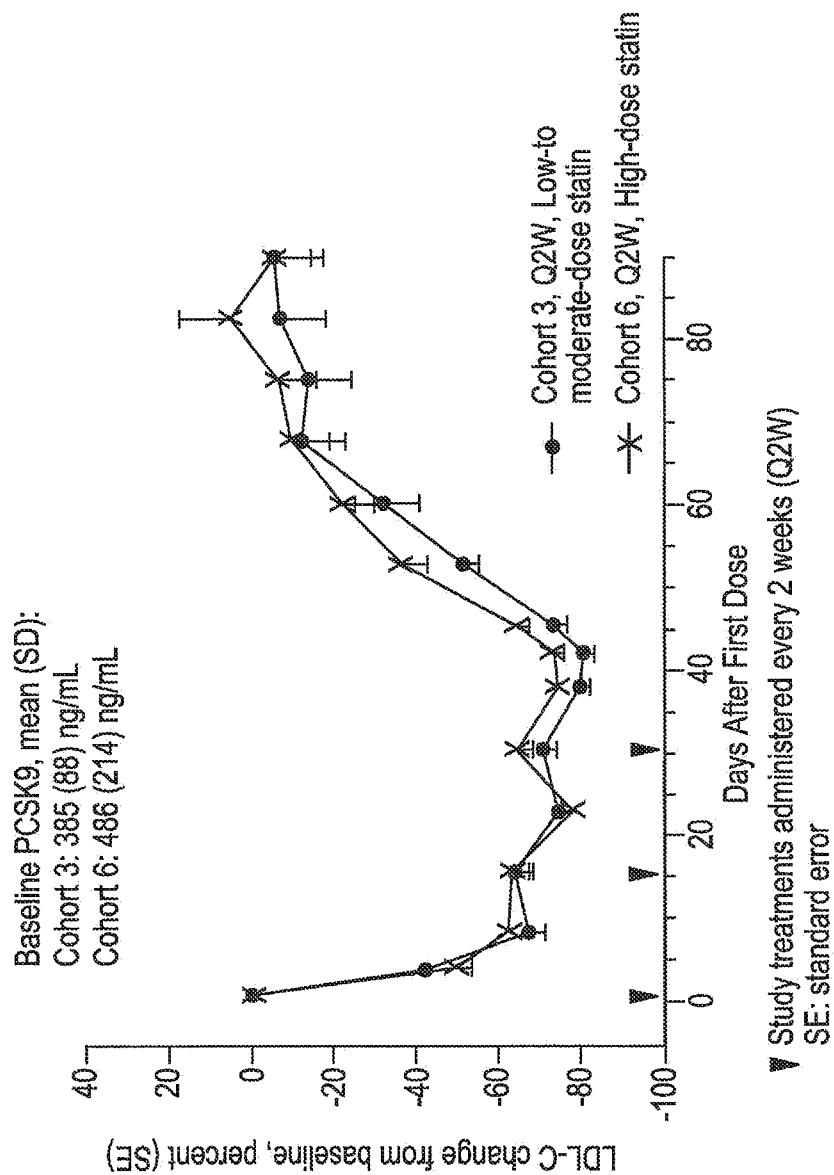
Group 5 (2 members)									
H_CDR1									
SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ	SEQ
ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:	NO:
1									71
CONSENSUS	SIAMN	361	TISSG	NTYYADSVKG	362	KEVIMVYMLDY	363		
25G4		361	G.....	364		363			
23B5		361	D.....	365		363			

FIG. 14



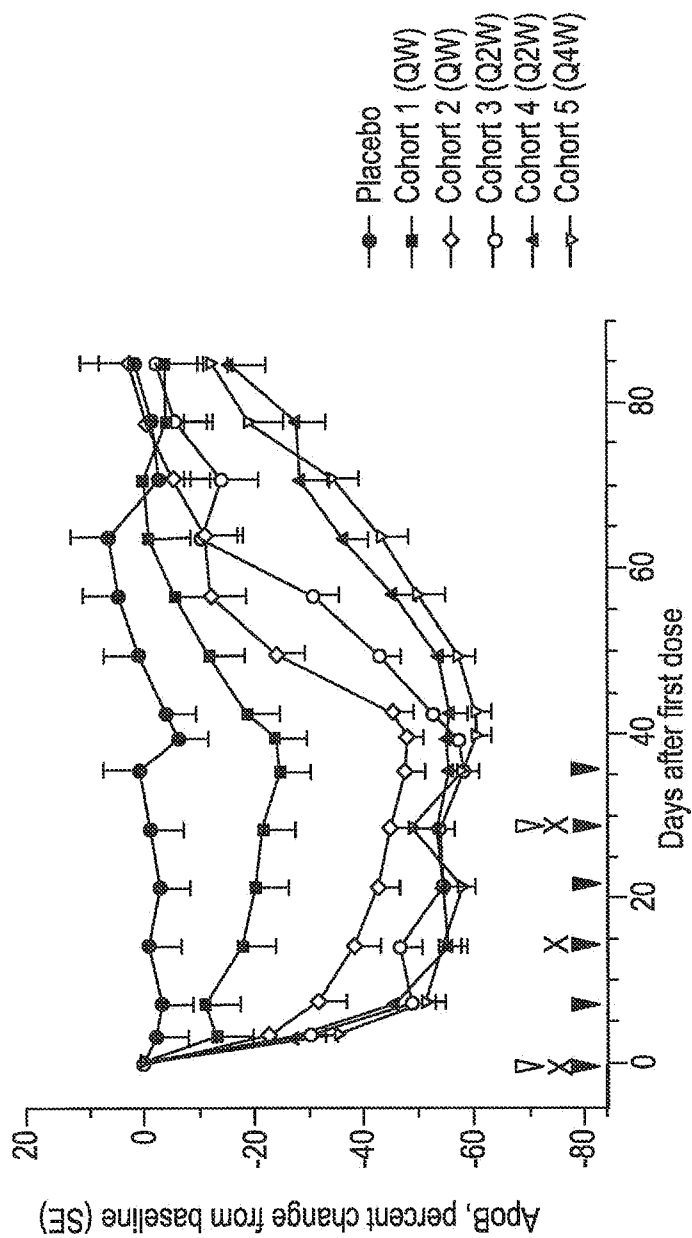
Leif

FIG. 15



Leptin

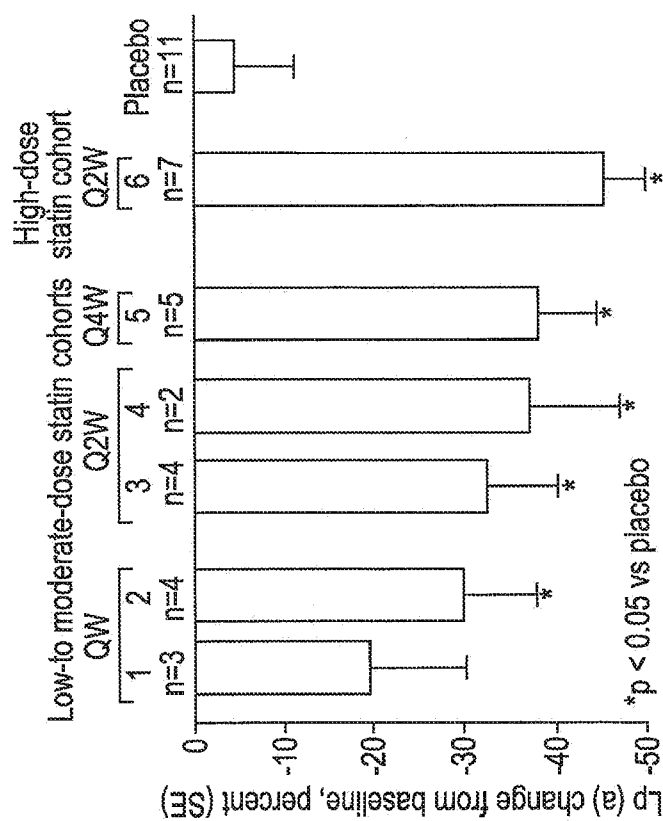
FIG. 16



Study treatments administered:
 ▼ Once weekly (QW) X Every 2 weeks (Q2W) ▽ Every 4 weeks (Q4W)
 SE: standard error

Septi

FIG. 17

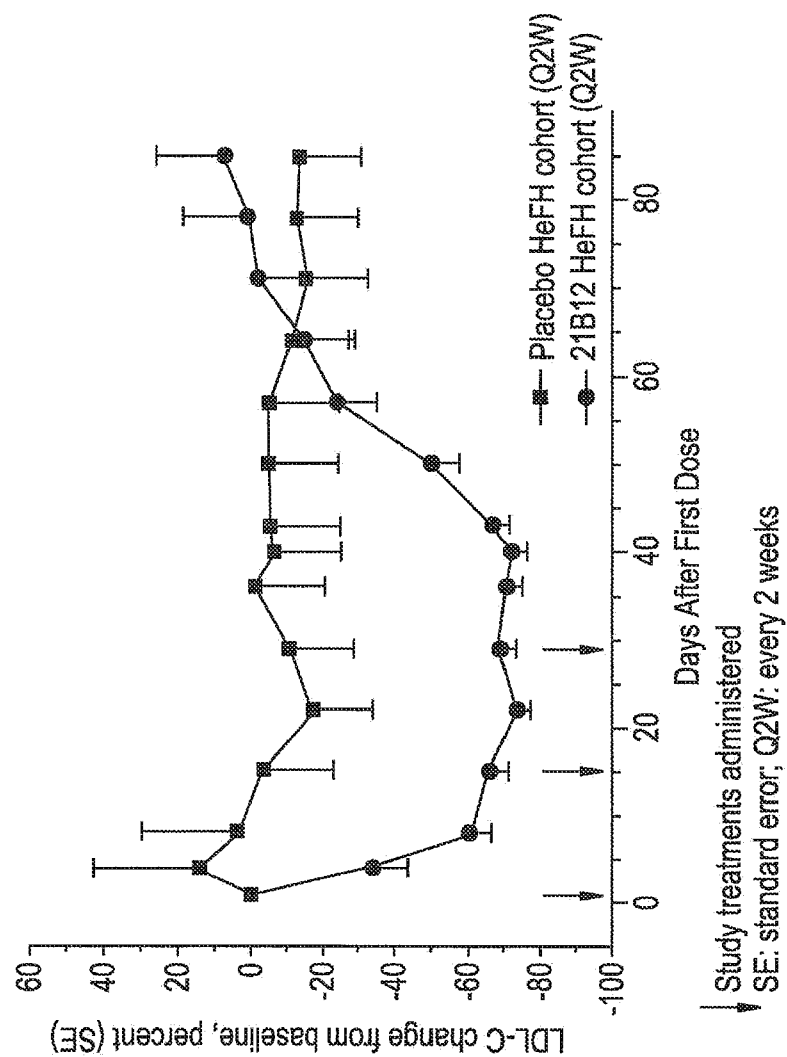


Outliers or subjects with baseline or screening values below the lower limit of quantitation were excluded from the analysis.

SE: standard error; QW: once weekly; Q2W: every 2 weeks; Q4W: every 4 weeks

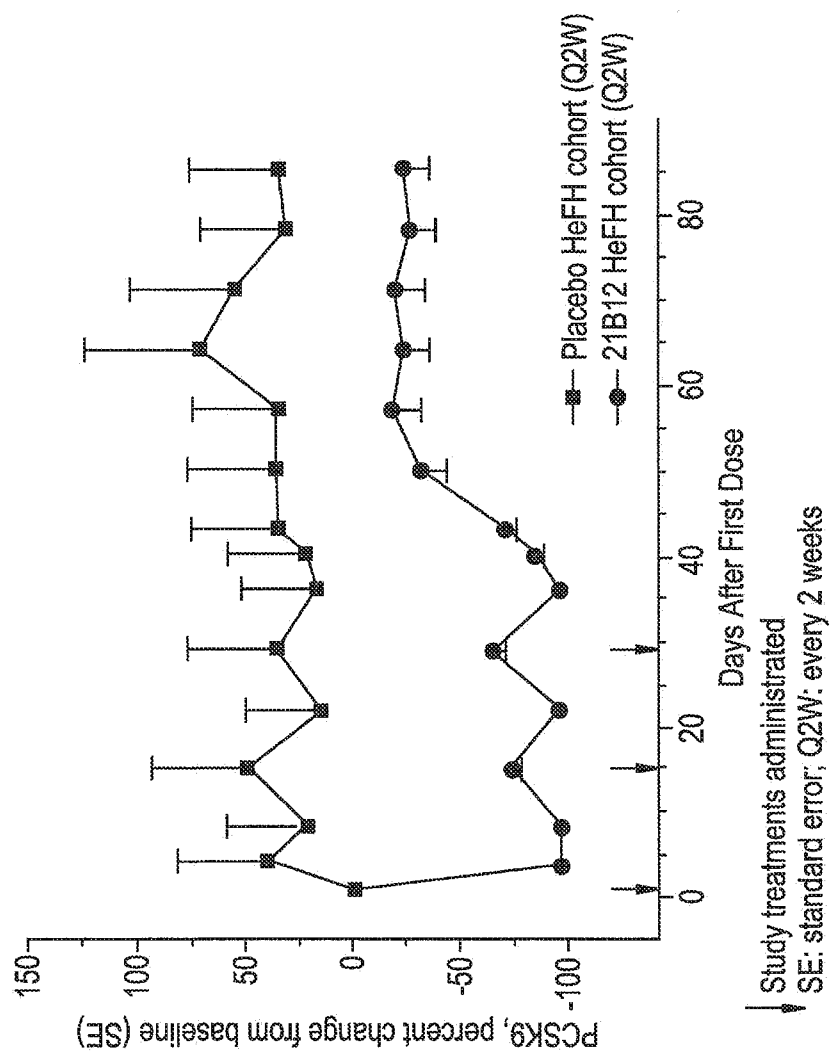
Fligge

FIG. 18



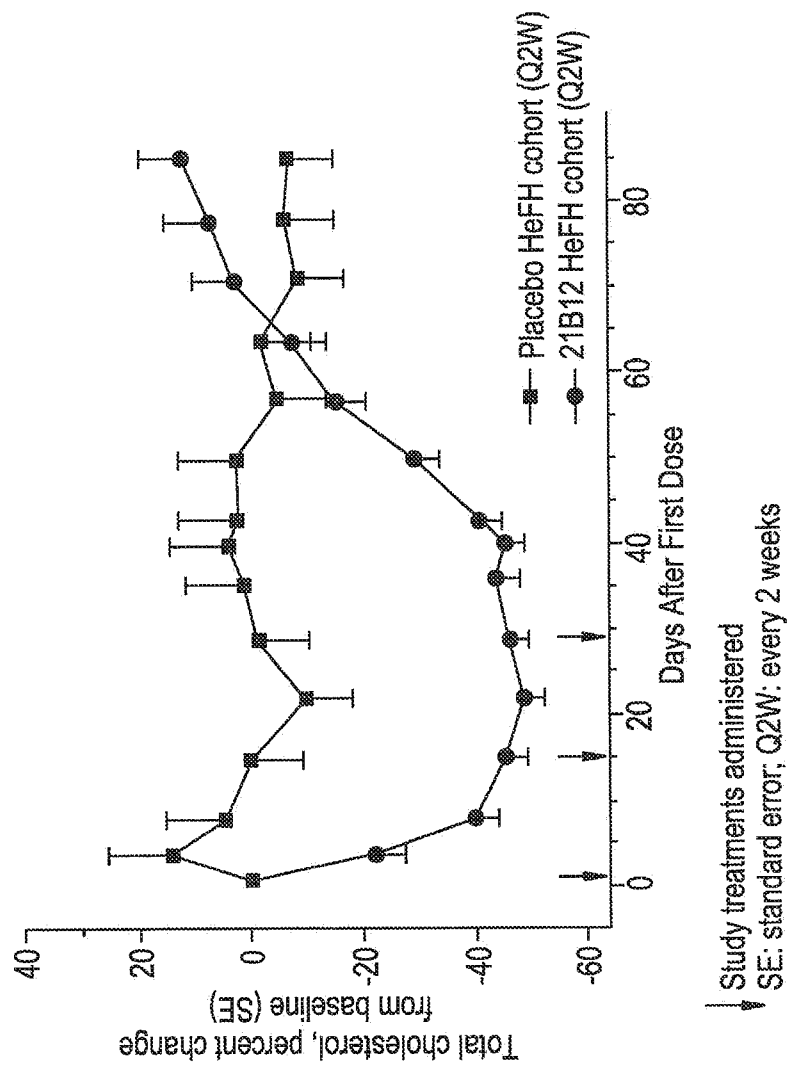
[Handwritten signature]

FIG. 19



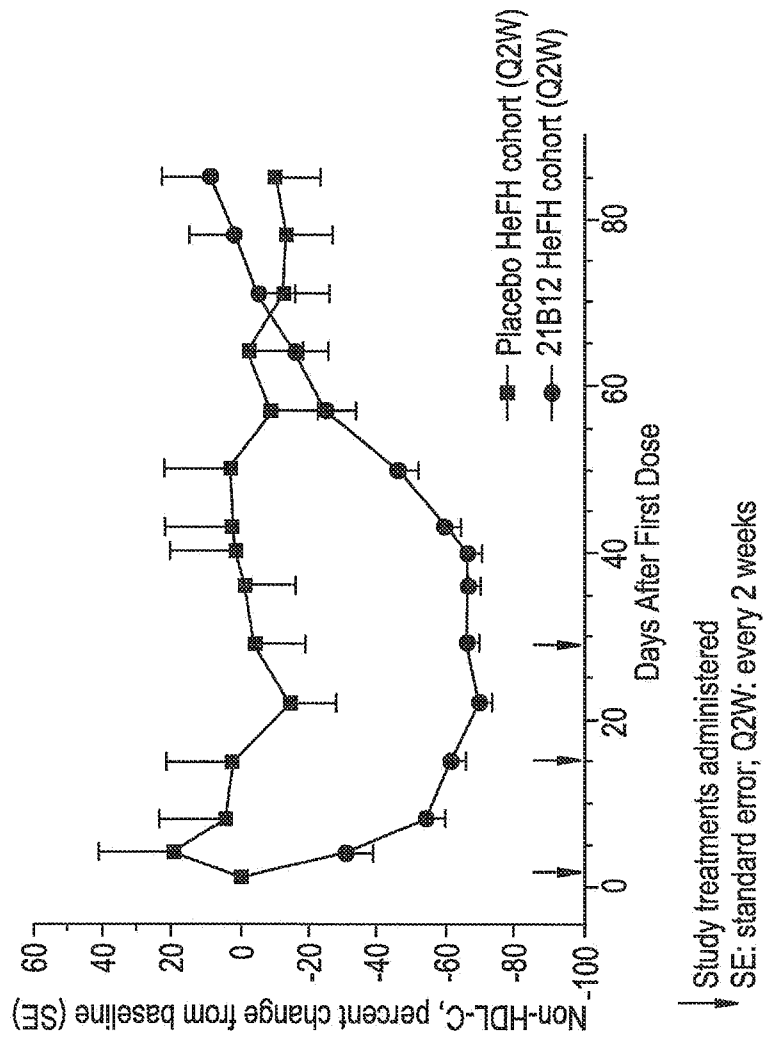
Flippin

FIG. 20



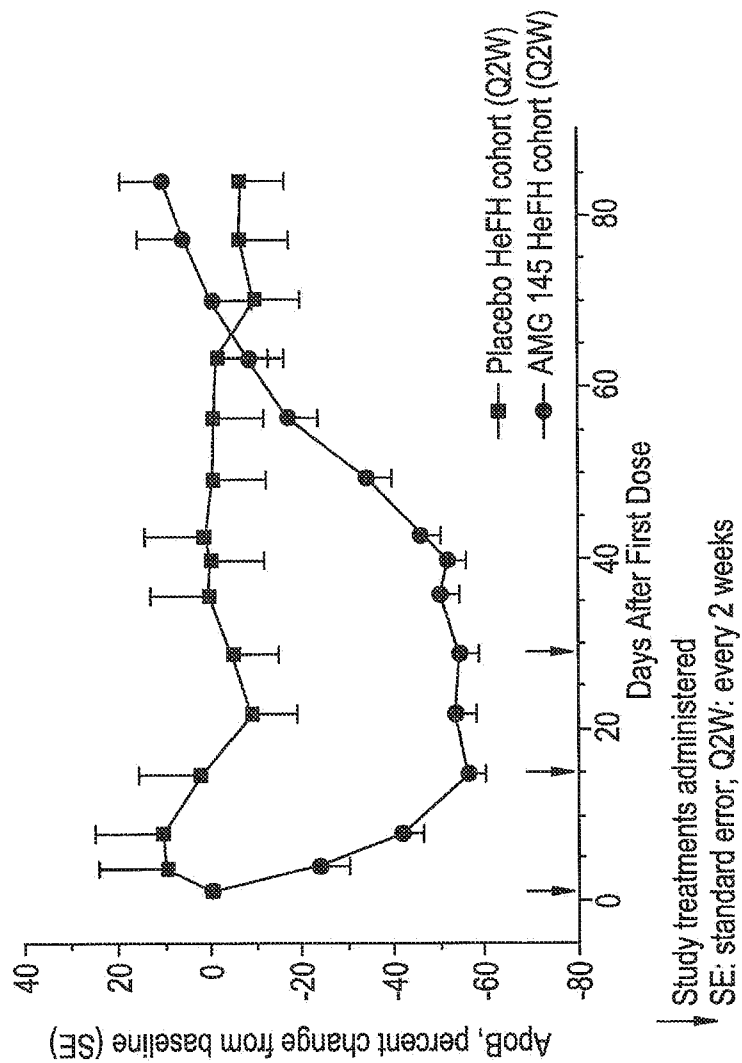
Leifert

FIG. 21



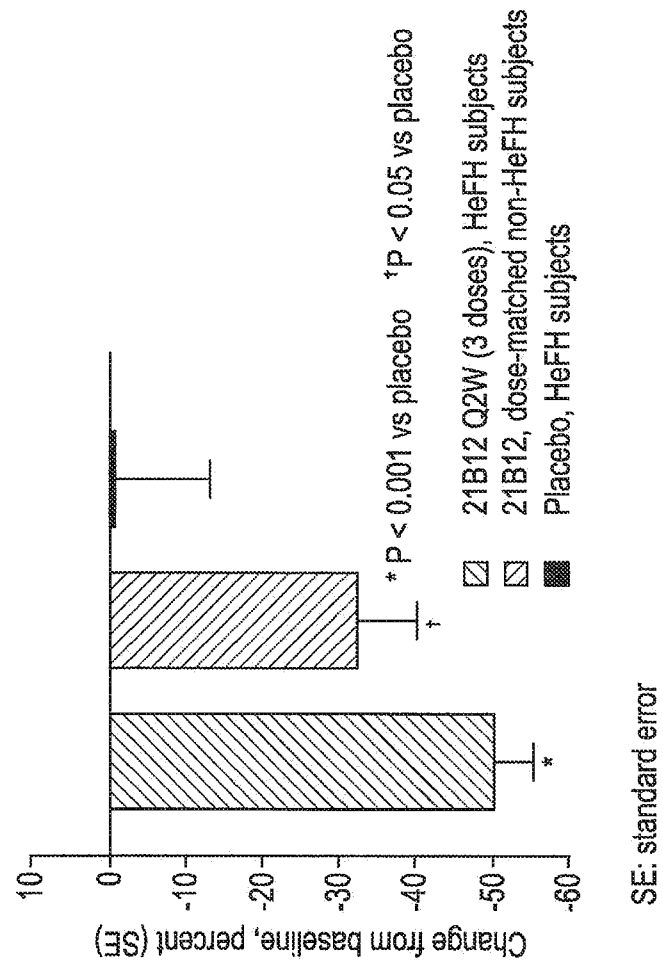
Levy et al.

FIG. 22



Signature

FIG. 23



Leif

FIG. 24A

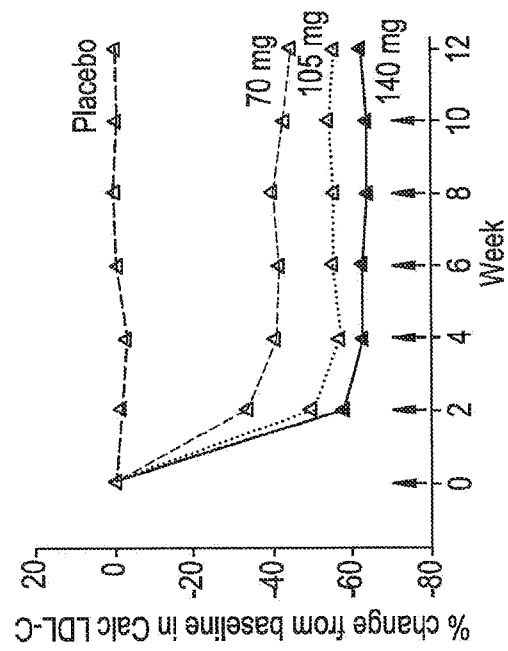
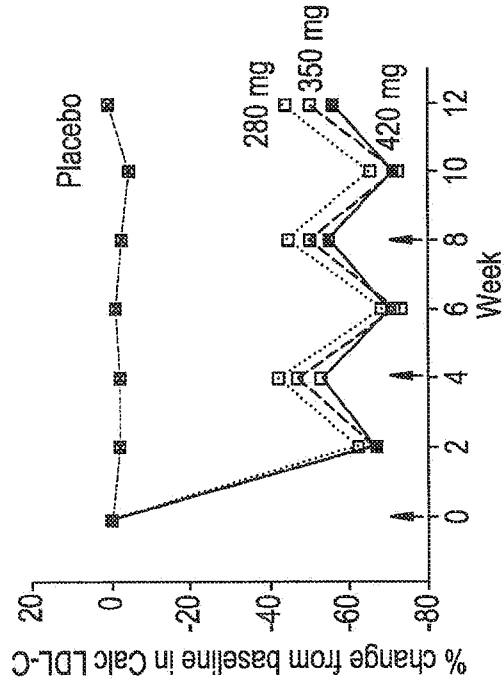


FIG. 24B



LC/PLT

FIG. 25A

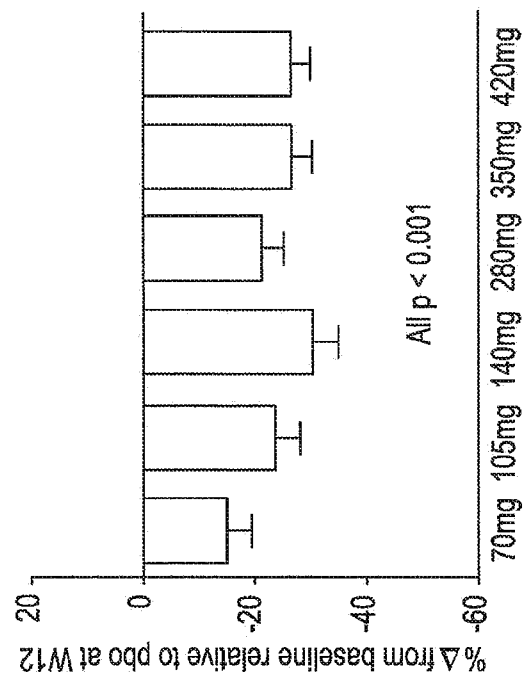


FIG. 25B

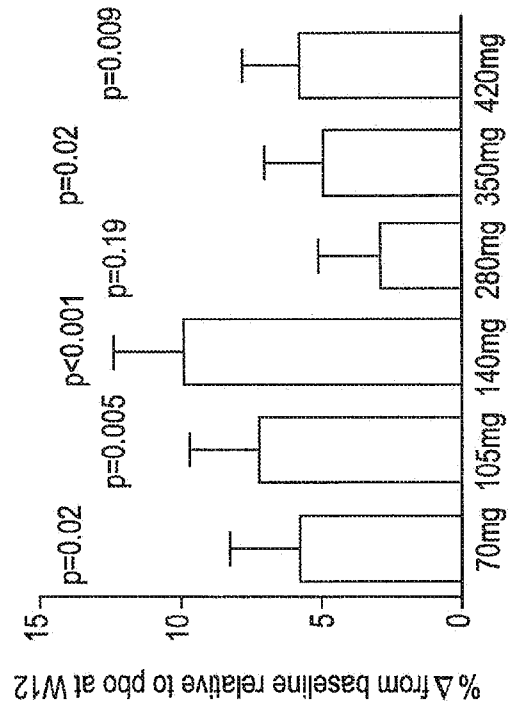


FIG. 25C

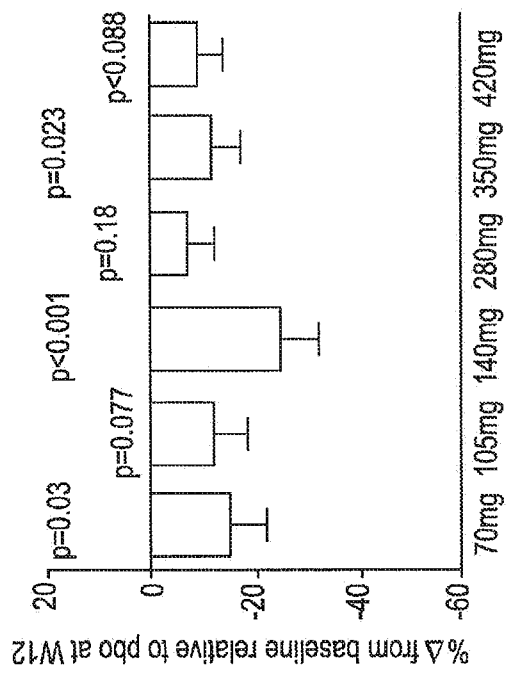
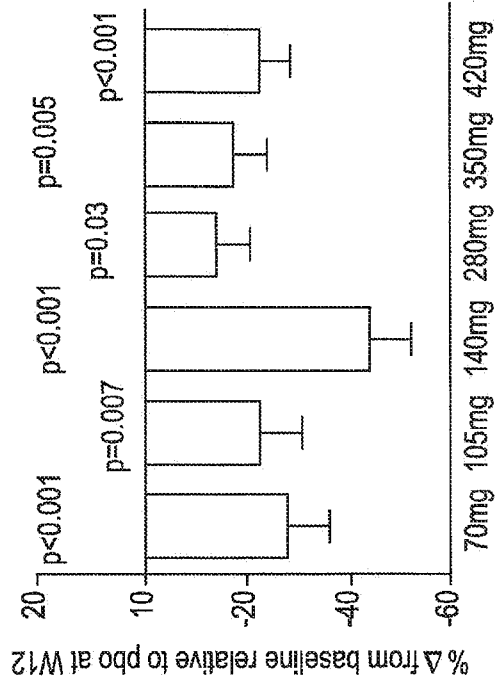
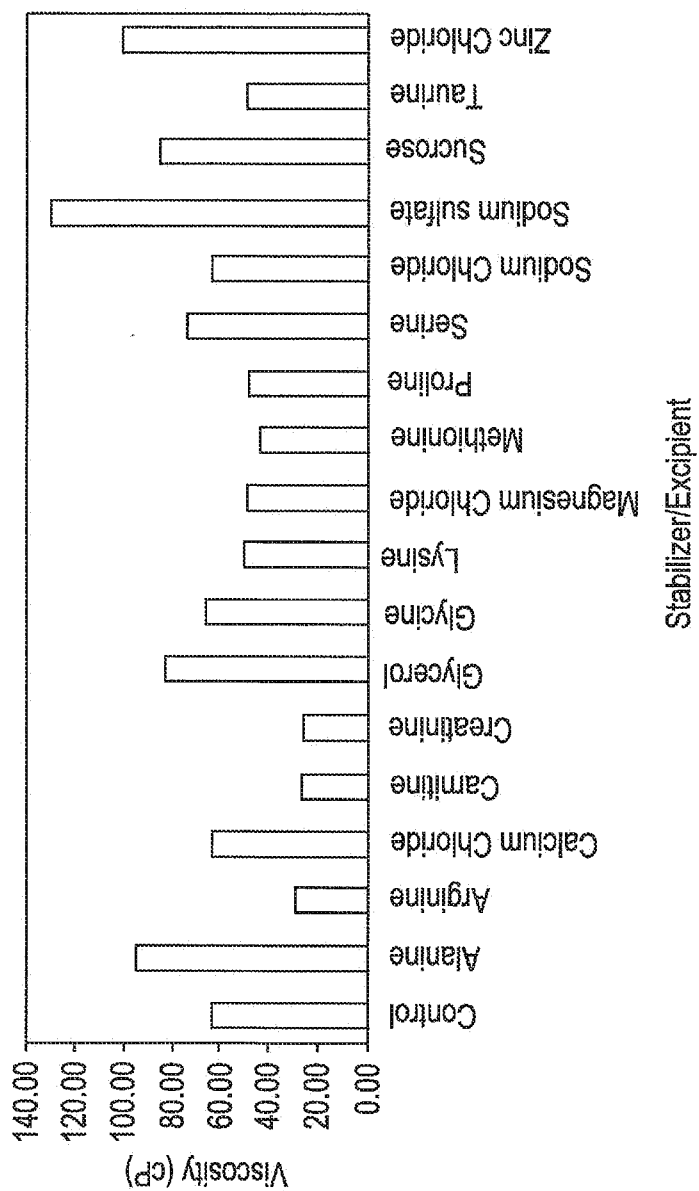


FIG. 25D



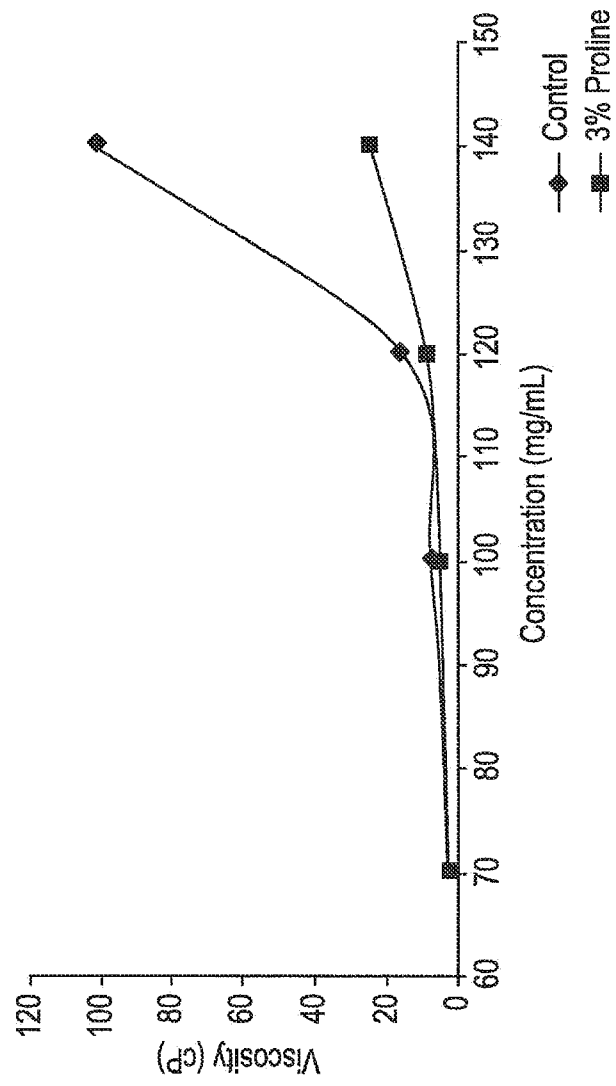
Jeffrey

FIG. 26



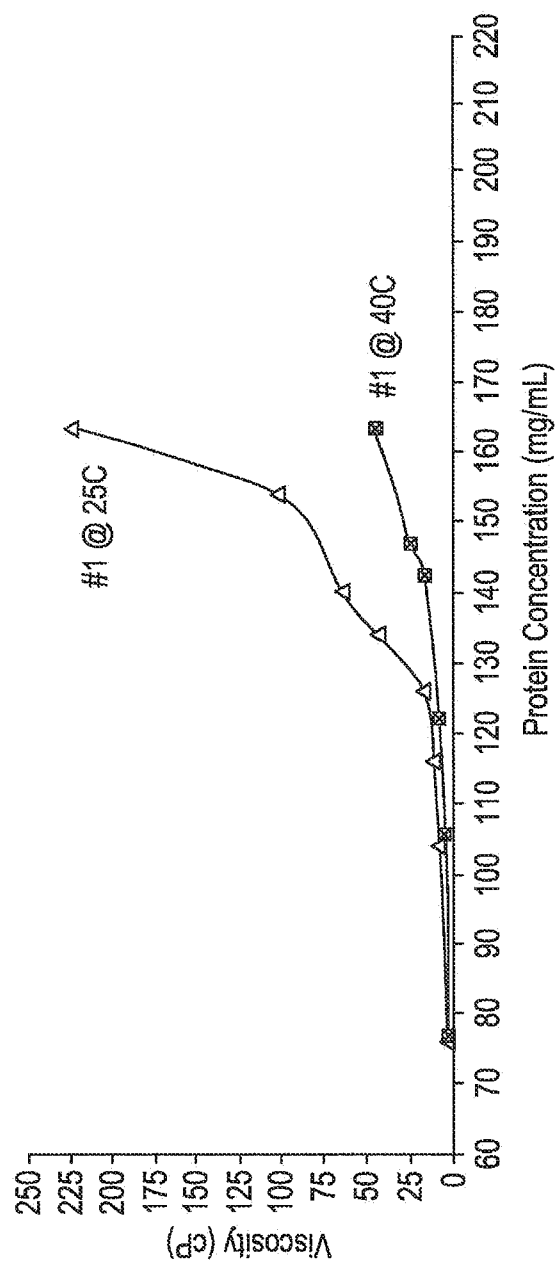
FCP/PLA

FIG. 27



Lepti

FIG. 28A



LC/MS

FIG. 28B

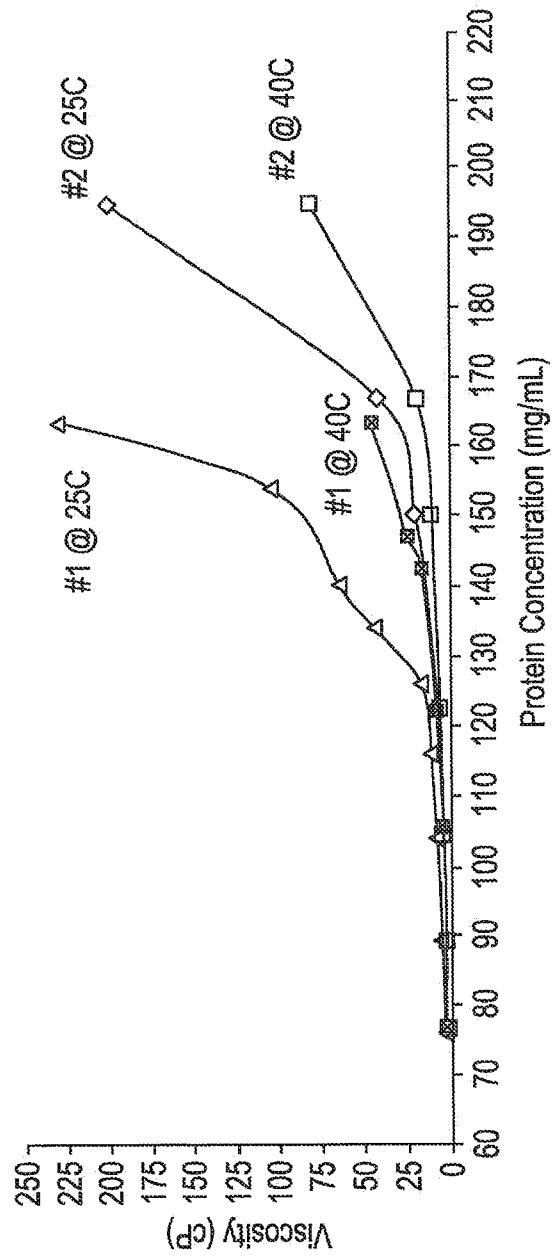
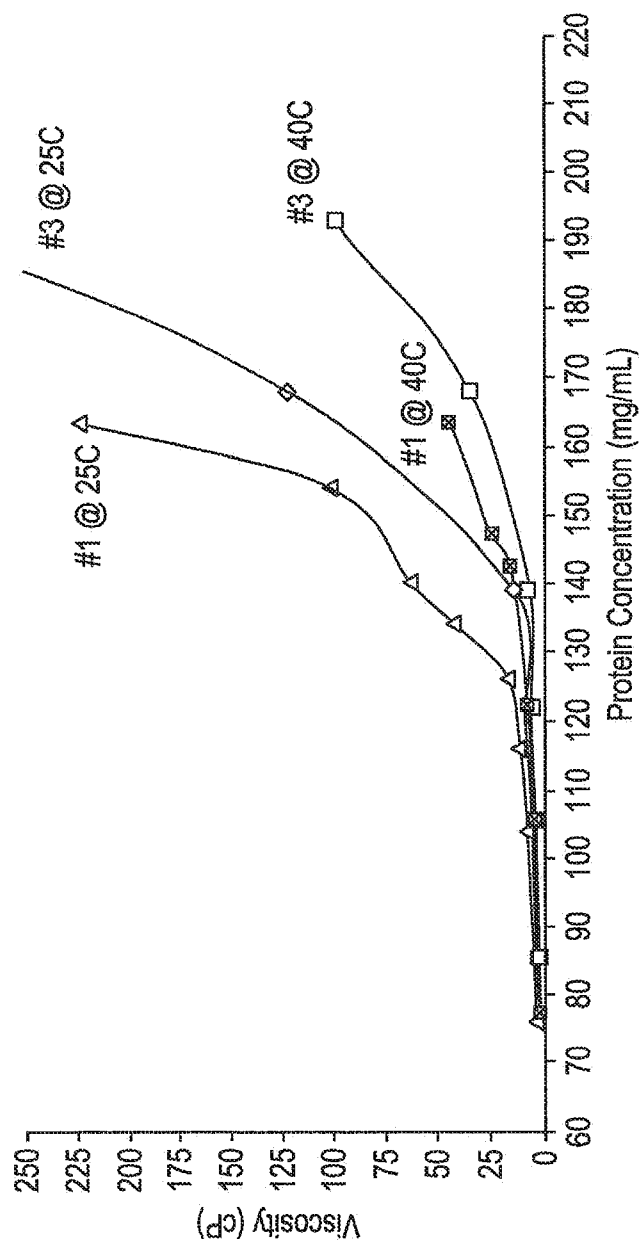
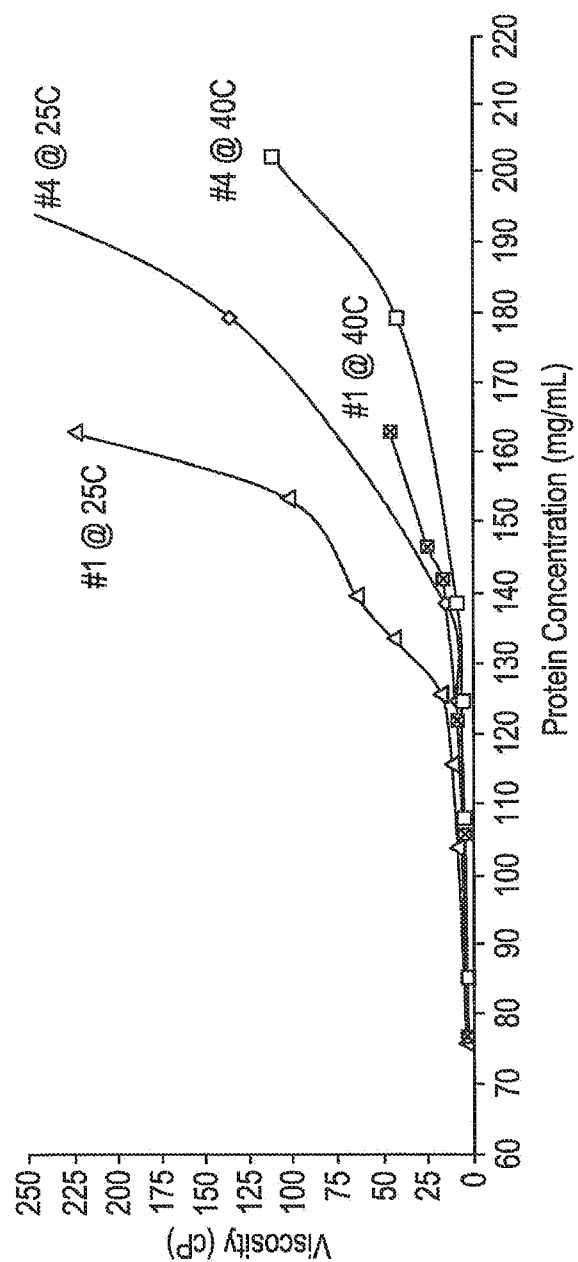


FIG. 28C



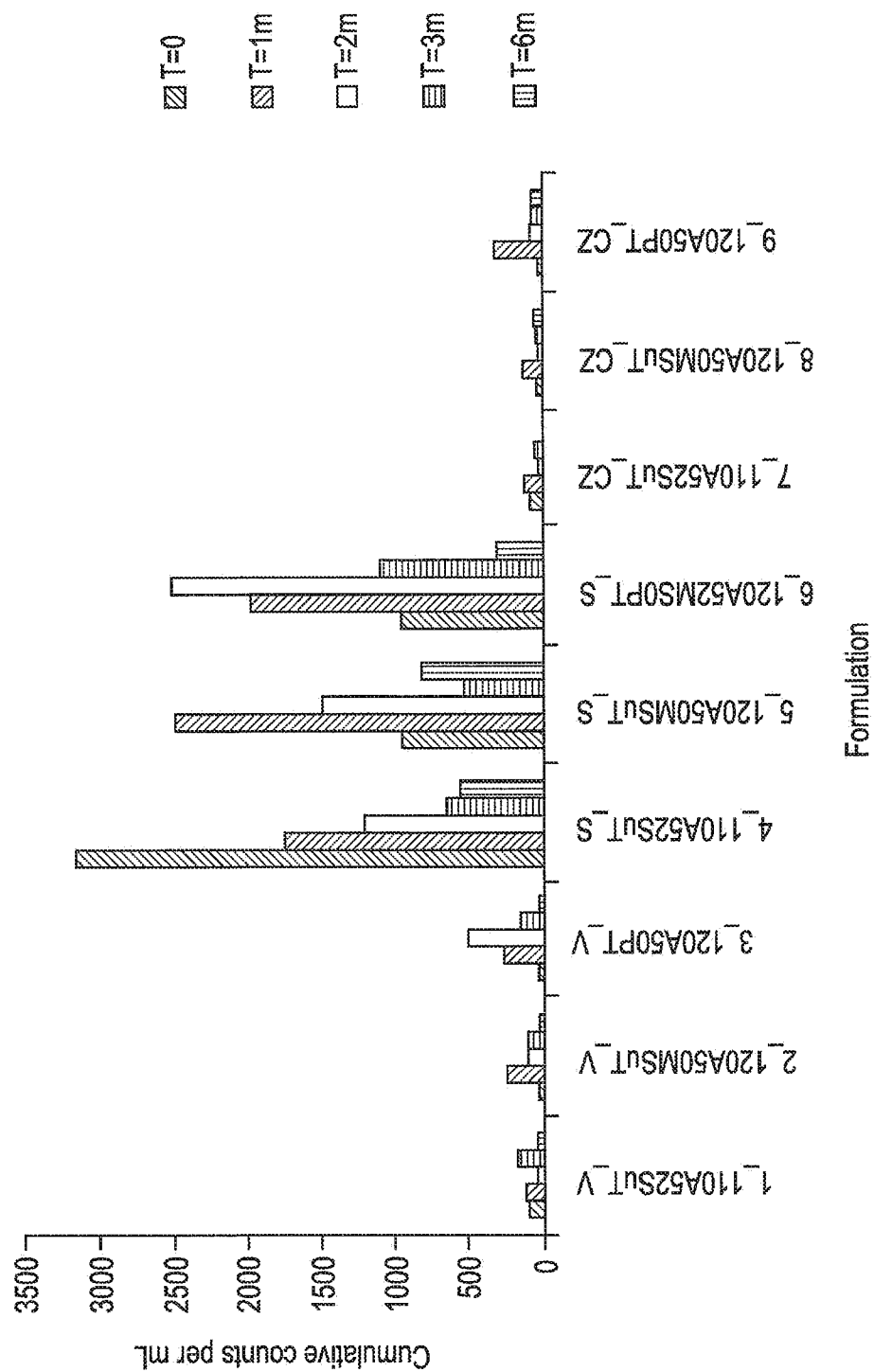
Leppik

FIG. 28D



Jeffrey

FIG. 29A



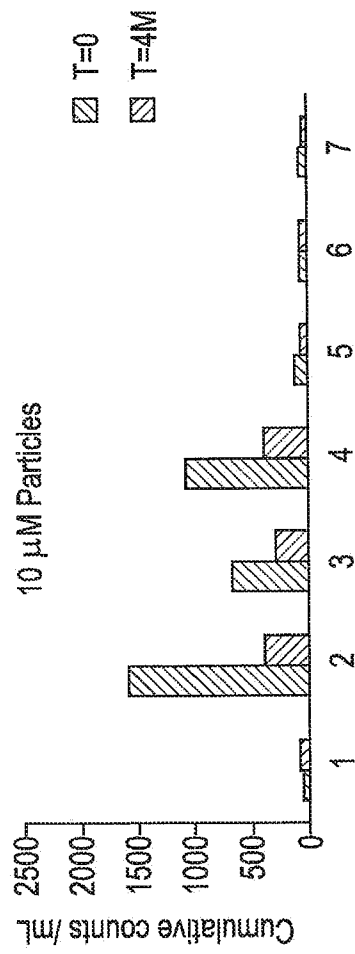
Leptin

FIG. 29B



Signature

FIG. 30A



Leppä

FIG. 30B

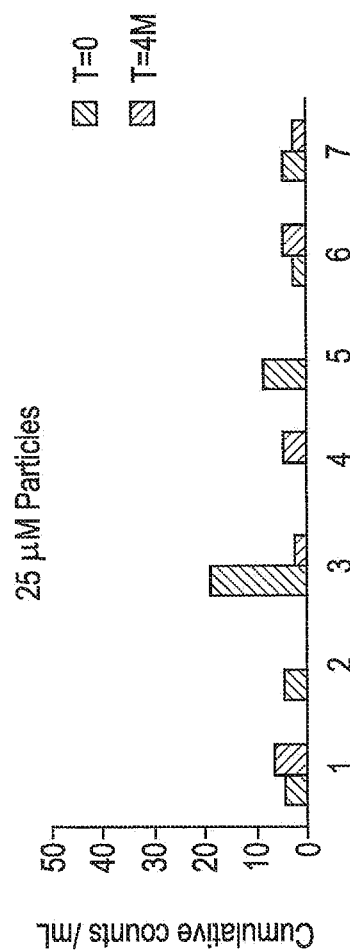


FIG. 31

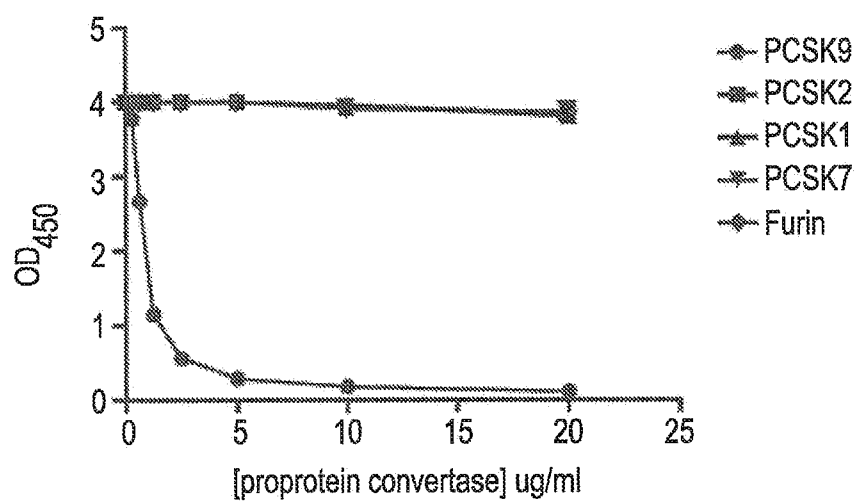


FIG. 32

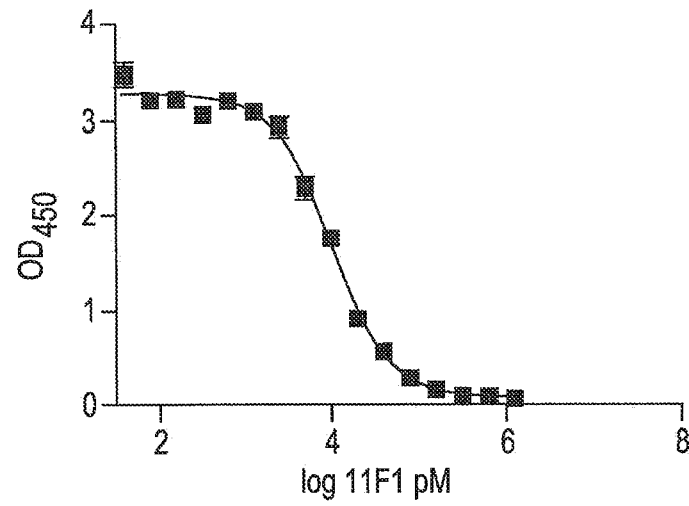


FIG. 33

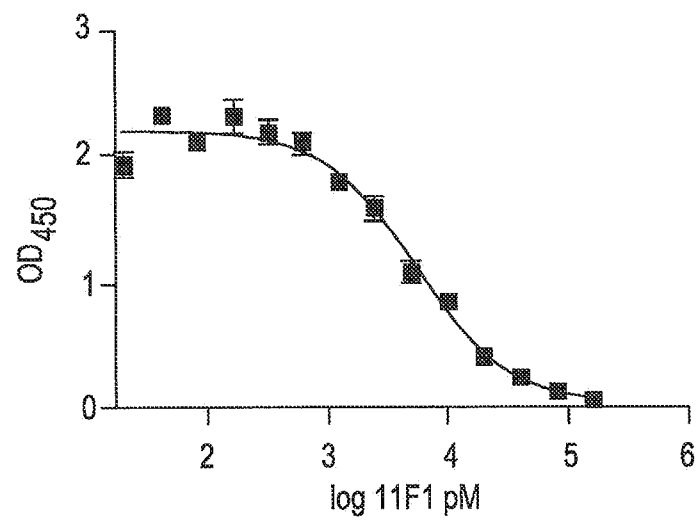


FIG. 34

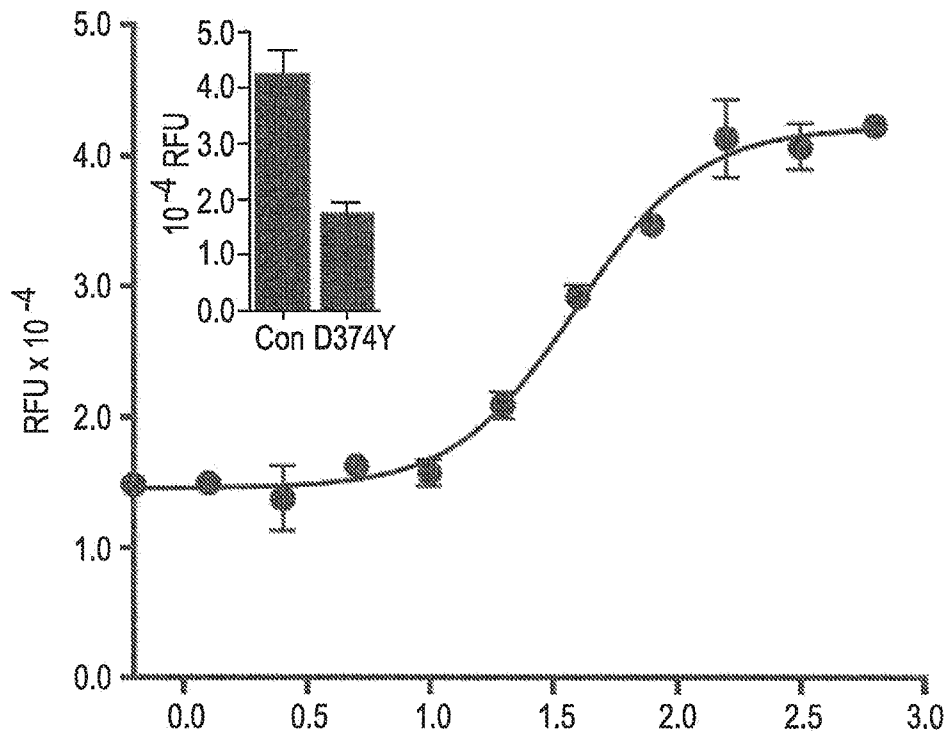


FIG. 35

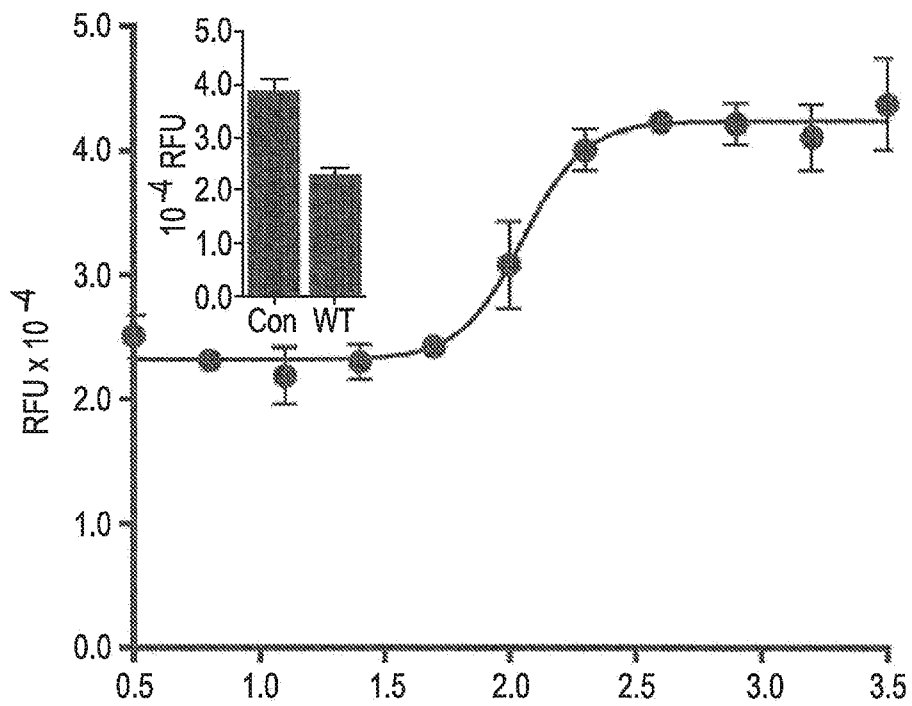
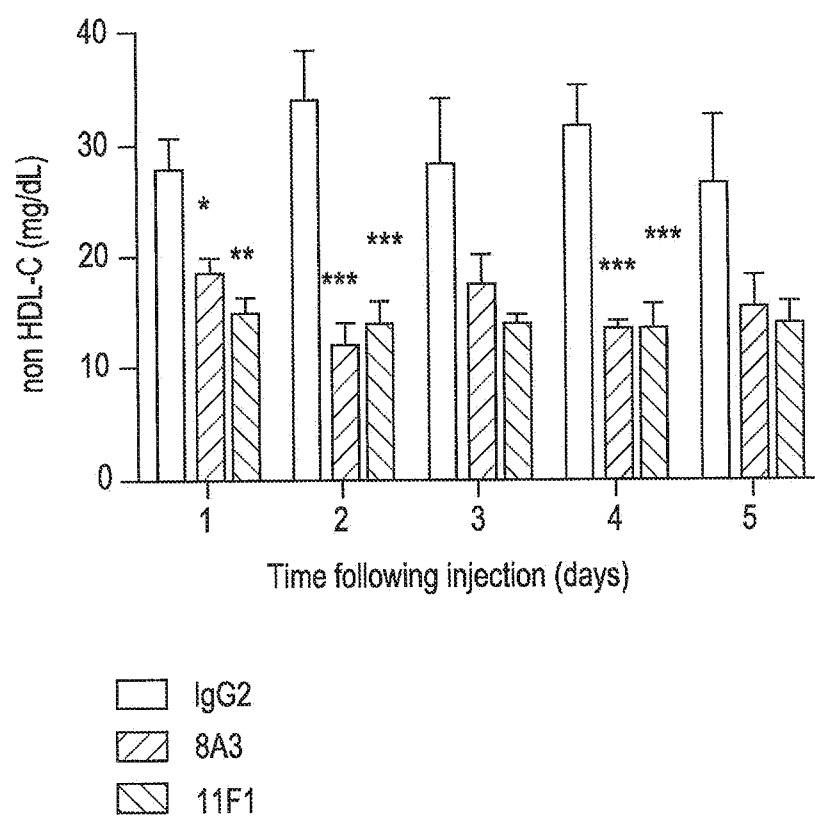


FIG. 36



Leif

FIG. 37

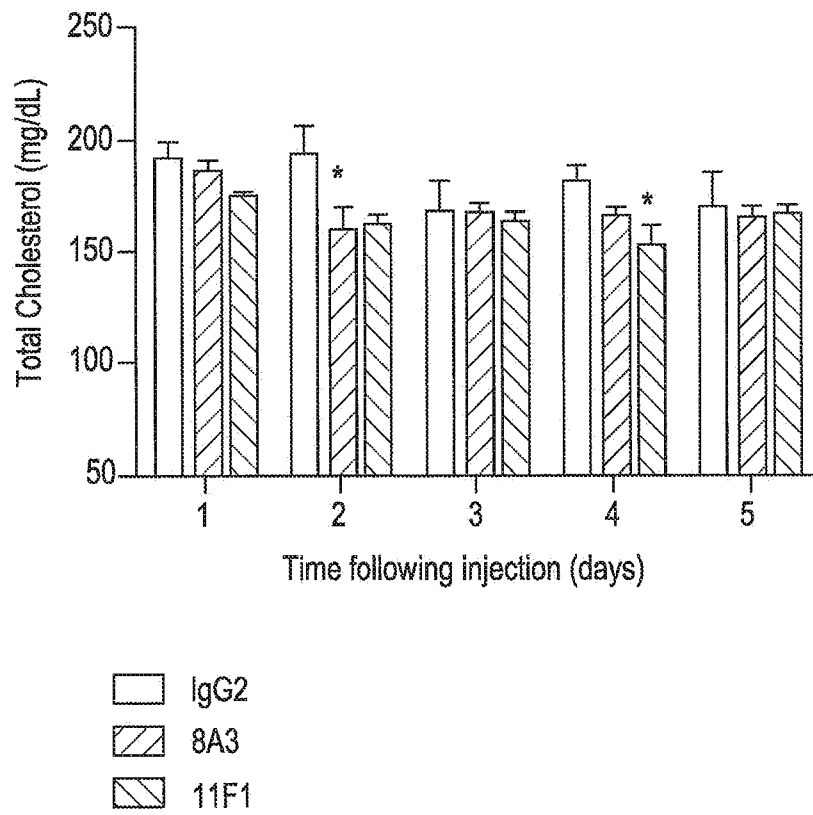


FIG. 38

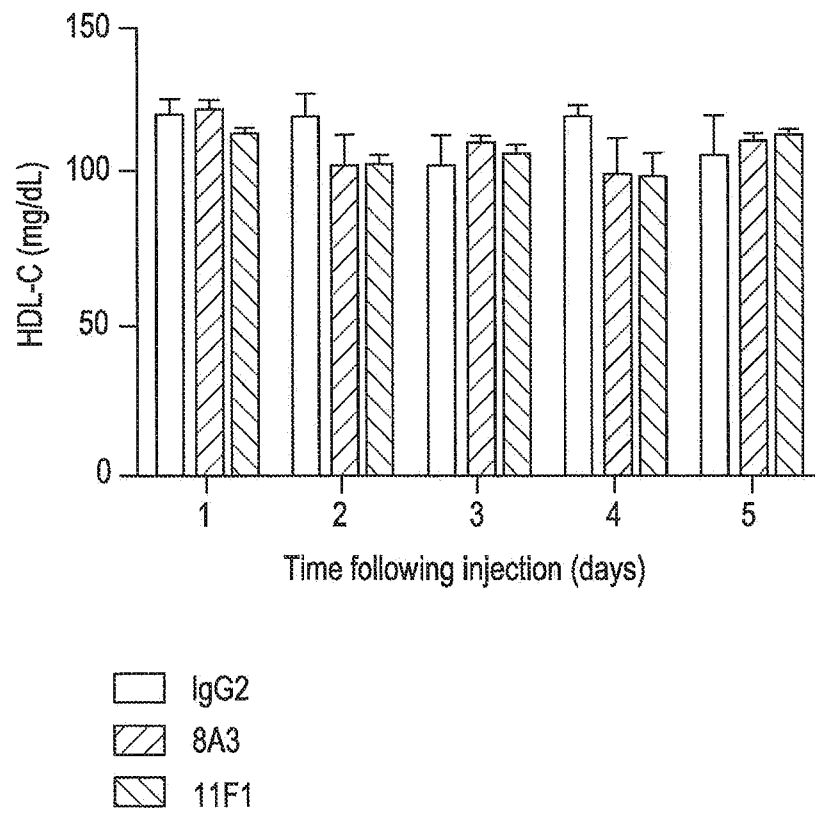


FIG. 39

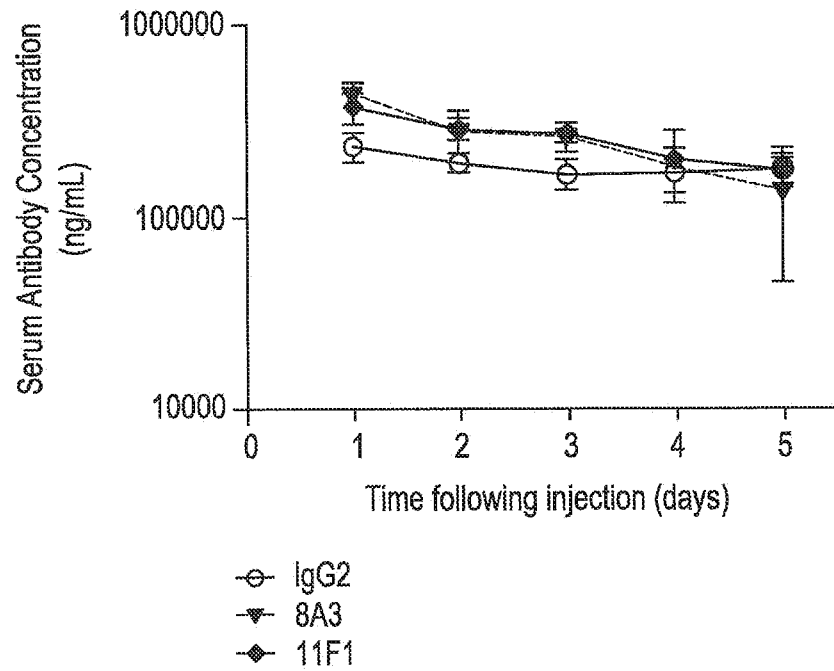


FIG. 40

Antibody	AUC _{0-t} (μg·h/mL)	CL _{0-t} (mL/h/kg)	Apparent t _{1/2} (h)
IgG2	23,500	0.511	>120
11F1	34,700	0.865	83
8A3	36,700	0.817	59

FIG. 41

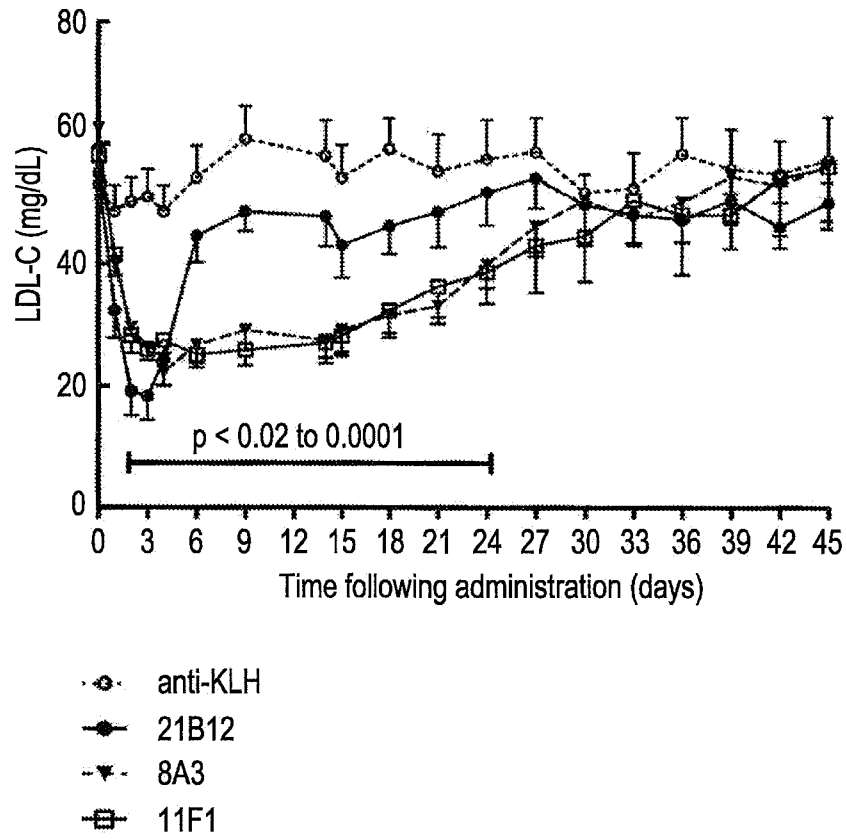


FIG. 42

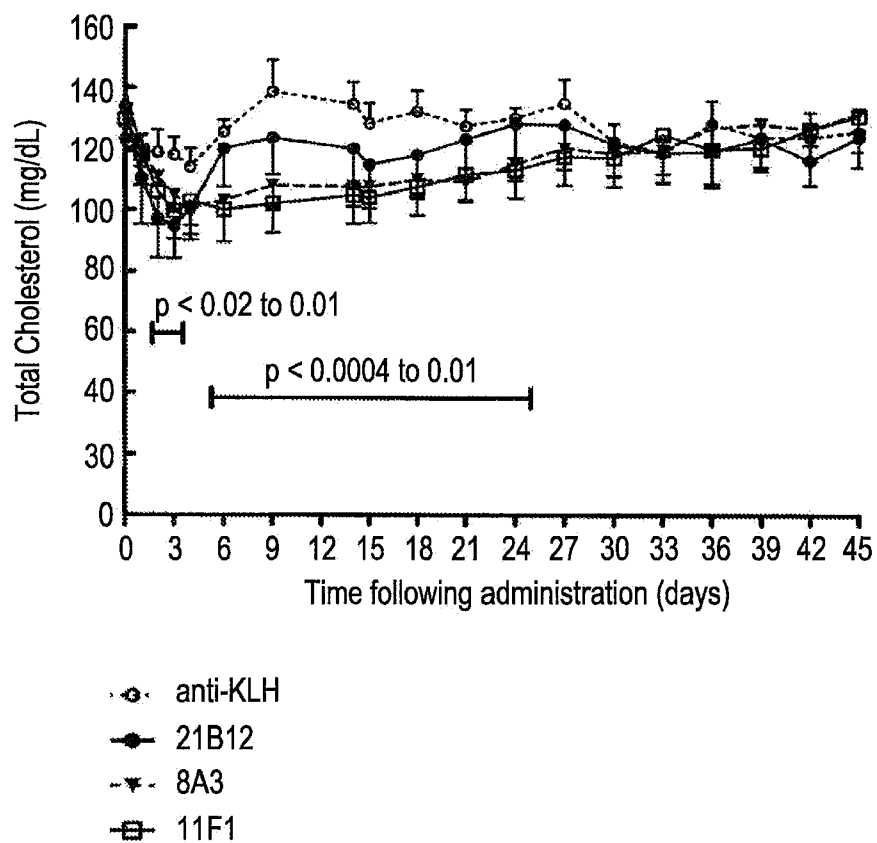
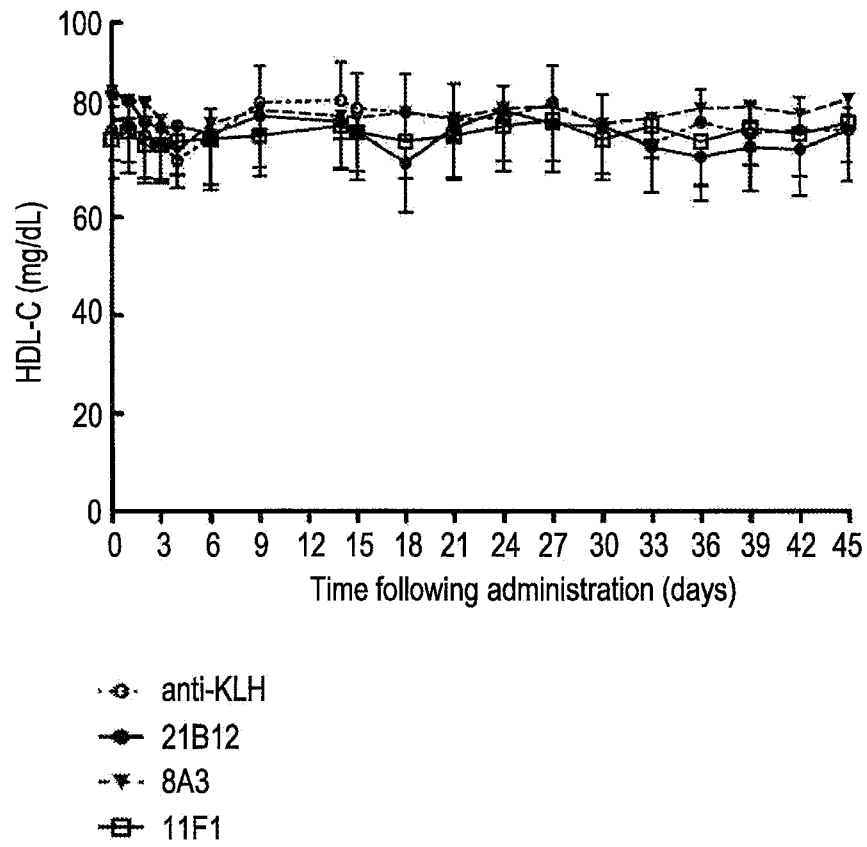


FIG. 43



Left

FIG. 44

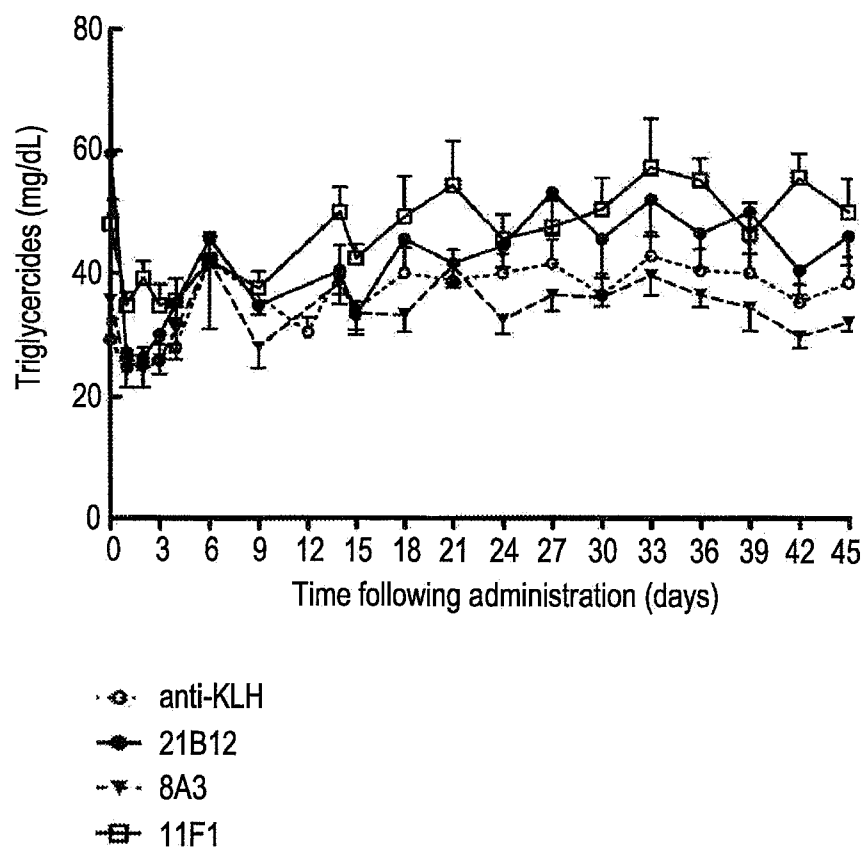


FIG. 45

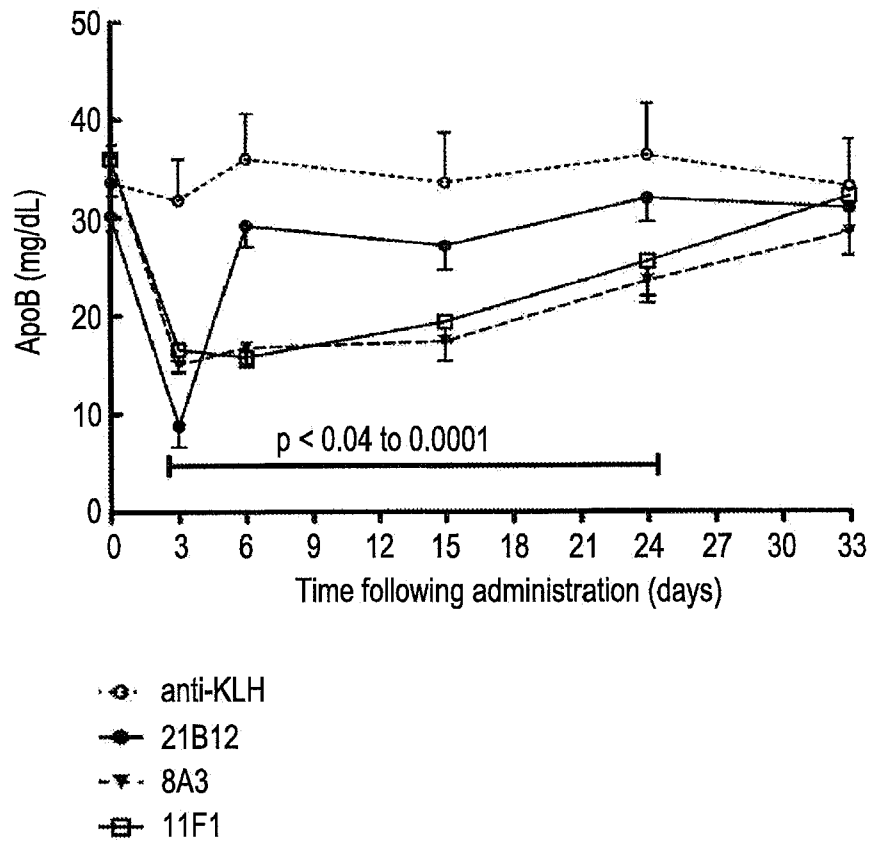


FIG. 46

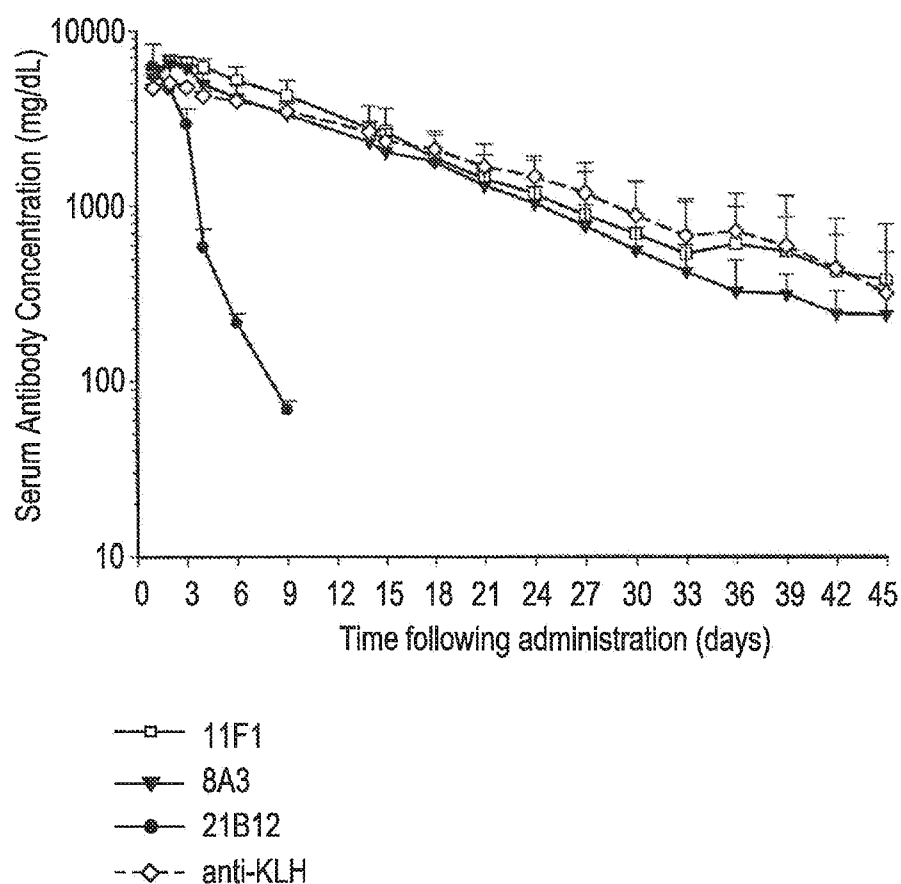


FIG. 47

Mean ($\pm$ SD) Pharmacokinetic Parameters				
Antibody	$t_{1/2,z}$ (h)	CL/F (mL/h/kg)	C _{max} (μ g/mL)	AUC _{0$\rightarrow$$\infty$} (μ g $\cdot$ h/mL)
Anti-KLH	220 $\pm$ 130	0.234 $\pm$ 0.036	5.08 $\pm$ 0.15	2,170 $\pm$ 320
21B12	40 $\pm$ 6	1.57 $\pm$ 0.68	6.22 $\pm$ 2.21	355 $\pm$ 109
11F1	210 $\pm$ 110	0.228 $\pm$ 0.081	6.72 $\pm$ 0.62	2,440 $\pm$ 910
8A3	190 $\pm$ 40	0.255 $\pm$ 0.039	6.63 $\pm$ 0.66	1,990 $\pm$ 290

FIG. 48A

Light Chain Variable Sequence Comparison and Consensus Sequence
(HCDR1, HCDR2 and HCDR3 are underlined):

8A1: Light Chain Variable Sequence (SEQ ID NO:485); LCDR1 (SEQ ID NO:503); LCDR2 (SEQ ID NO:504); LCDR3 (SEQ ID NO:558)
8A3: Light Chain Variable Sequence (SEQ ID NO:461); LCDR1 (SEQ ID NO:503); LCDR2 (SEQ ID NO:4); LCDR3 (SEQ ID NO:558)
11F1: Light Chain Variable Sequence (SEQ ID NO:465); LCDR1 (SEQ ID NO:503); LCDR2 (SEQ ID NO:504); LCDR3 (SEQ ID NO:505)
Consensus: Light Chain Variable Sequence (SEQ ID NO:582); LCDR1 (SEQ ID NO:503); LCDR2 (SEQ ID NO:504); LCDR3 (SEQ ID NO:584)

8A1: 1-DIVMTQSP^LSLPVT^PGPASISCRSSQSL^LHSNGYNYLDWY^LQKPGQSPQ^LLIY^LLGSNRA
8A3: 1-DIVMTQSP^LSLPVT^PGPASISCRSSQSL^LHSNGYNYLDWY^LQKPGQSPQ^LLIY^LLGSNRA
11F1: 1-DIVMTQSP^LSLPVT^PGPASISCRSSQSL^LHSNGYNYLDWY^LQKPGQSPQ^LLIY^LLGSNRA
Consensus: 1-DIVMTQSP^LSLPVT^PGPASISCRSSQSL^LHSNGYNYLDWY^LQKPGQSPQ^LLIY^LLGSNRA

8A1: SGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGKVEIK-112 (SEQ ID NO:485)
8A3: SGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGKVEIK-112 (SEQ ID NO:461)
11F1: SGVPDRFSGSGT^HLTKISRVEAEDVGVYYCMOTLQTPLTFGGGKVEIK-112 (SEQ ID NO:465)
Consensus: SGVPDRFSGSGGT^X₁X₂TLKISRVEAEDVGVYYCMQX₁LOTPLTFGGGKVEIK-112 (SEQ ID NO:582)

X₁ is H or D; X₂ is F or L; and X₃ is T or A

FIG. 48B

Heavy Chain Variable Sequence Comparison And Consensus Sequence
(HCDR1, HCDR2 and HCDR3 are underlined):

8A1: Heavy Chain Variable Sequence (SEQ ID NO:459); HCDR1 (SEQ ID NO:513); HCDR2 (SEQ ID NO:528); HCDR3 (SEQ ID NO:534)
8A3: Heavy Chain Variable Sequence (SEQ ID NO:461); HCDR1 (SEQ ID NO:501); HCDR2 (SEQ ID NO:501); HCDR3 (SEQ ID NO:502)
11F1: Heavy Chain Variable Sequence (SEQ ID NO:463); HCDR1 (SEQ ID NO:501); HCDR2 (SEQ ID NO:501); HCDR3 (SEQ ID NO:502)
Consensus: Heavy Chain Variable Sequence (SEQ ID NO:583); HCDR1 (SEQ ID NO:585); HCDR2 (SEQ ID NO:586); HCDR3 (SEQ ID NO:587)

8A3: 1-EVQLVESGGGLVQP⁶¹GGSLRLSCAASGFTFSYWM⁶²SVVRQAPGKGLEWV⁶³ASIKODGSEKYY
11F1: 1-EVQLVESGGGLVQP⁶¹GGSLRLSCAASGFTFSYWM⁶²SVVRQAPGKGLEWV⁶³ASIKODGSEKYY
8A1: 1-EVQLVESGGGLVQP⁶¹GGSLRLSCAASGFTFSYWM⁶²SVVRQAPGKGLEWV⁶³ASIKODGSEKYY
Consensus: 1-EVQLVESGGGLVQP⁶¹GGSLRLSCAASGFTFSX₁YWMX₂WVRQAPGKGLEWV⁶³ASIKODGSEKYY

8A3: 61-VDSVKGRFTISRDNARNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDL⁶²VLMVYDIDYYYYGMDVW
11F1: 61-VDSVKGRFAISRDNARNLSFLQMNSLRAEDTAVYYCARDL⁶²VLMVYDIDYYYYGMDVW
8A1: 61-VDSVKGRFTISRDTAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPL⁶²YLMVYALHYYYGMDVW
Consensus: 61-VDSVKGRFX₄ISRDX₅AX₆NSLX₇LQMNSLRAEDTAVYYCARX₈L⁶²VLMVYX₉X₁₀A₁₁Y⁶³YYGMDVW

8A3: GQGTTVTVSS-127 (SEQ ID NO:459)
11F1: GQGTTVTVSS-127 (SEQ ID NO:463)
8A1: GHGTTVTVSS-127 (SEQ ID NO:483)
Consensus: GX₁₂GTTVTVSS-127 (SEQ ID NO:583)

X₁ is S or N; X₂ is S or T; X₃ is K or R; X₄ is A or T; X₅ is N or T; X₆ is K or R; X₇ is Y or F; X₈ is D or P;
X₉ is D or A; X₁₀ is I or L; X₁₁ is D or H; and X₁₂ is Q or H