

República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0810551-0 A2



(22) Data do Depósito: 11/04/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 23/10/2008

(54) **Título:** MOLÉCULAS E MÉTODOS PARA MODULAÇÃO DA PRÓ-PROTEÍNA CONVERTASE SUBTILISINA/QUEXINA TIPO 9 (PCSK9)

(51) **Int. Cl.:** C07K 16/40; C12N 9/64.

(30) **Prioridade Unionista:** 13/04/2007 US 60/911,654.

(71) **Depositante(es):** NOVARTIS AG.

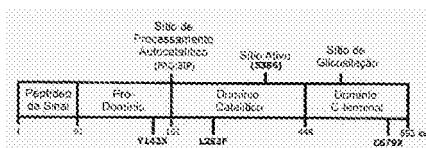
(72) **Inventor(es):** DMITRI MIKHAILOV; DAVID LONGDON YOWE; TONY FLEMING.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2008054417 de 11/04/2008

(87) **Publicação PCT:** WO 2008/125623 de 23/10/2008

(85) **Data da Fase Nacional:** 13/10/2009

(57) **Resumo:** Patente de Invenção: "MOLÉCULAS E MÉTODOS PARA MODULAÇÃO DA PRÓ-PROTEÍNA CONVERTASE SUBTILISINA/QUEXINA TIPO 9 (PCSK9)". A presente invenção refere-se a epitopos de Pró-proteína convertase subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9), a composições que se ligam à PCSK9 e epitopos de PCSK9 a métodos de uso das composições.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MOLÉCULAS E MÉTODOS PARA MODULAÇÃO DA PRÓ-PROTEÍNA CONVERTASE SUBTILISINA/QUEXINA TIPO 9 (PCSK9)".

Campo da Técnica

5 A presente invenção refere-se a moléculas de ligação de antígeno, epitopos ligados por essas moléculas e métodos para uso das moléculas.

Antecedentes

10 A pró-proteína convertase subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9) (também conhecida como convertase 1 regulada por apoptose neural ou NARC-1) é um membro da subfamília tipo subtilisina secretora de proteinase K de serinas proteases (Naureckiene e outros, 2003 *Arc. Biochem. Biophys.* 420:55-67). A PCSK9 é uma proteína secretada expressa principalmente nos rins, fígado e intestinos. Ela tem três domínios: um pró-domínio inibidor
15 (aminoácidos 1-152; incluindo uma sequência de sinal nos aminoácidos 1-30), um domínio serina protease (aminoácidos 153-448) e um domínio C-terminal de 210 resíduos de comprimento (aminoácidos 449-692), que é rico em resíduos cisteína. A PCSK9 é sintetizada em um zimogénio que sofre clivagem autocatalítica entre o pró-domínio e domínio catalítico no retículo
20 endoplasmático. O pró-domínio permanece ligado à proteína madura após clivagem, e o complexo é secretado. O domínio rico em cisteína pode desempenhar um papel análogo aos domínios P (processamento) de outras serinas proteases tipo Furina/Quexina/Subtilisina, que parecem ser essenciais para dobra e regulação da protease ativada. Mutações em PCSK9 estão
25 associadas com níveis anormais de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) no plasma sanguíneo (Horton e outros, 2006 *Trends. Biochem. Sci.* 32(2):71-77).

Sumário

30 A presente invenção refere-se a epitopos de PCSK9, moléculas de ligação à PCSK9 e métodos de uso das moléculas. Moléculas de ligação à PCSK9 interagem com PCSK9 e modulam funções de PCSK9. Moléculas de ligação à PCSK9 podem ser usadas para aumentar os níveis de receptor

de LDL (LDL-R) e reduzir níveis de colesterol.

Em vários aspectos, a invenção provê moléculas de ligação à PCSK9 que modulam (por exemplo, inibem) uma ou mais funções biológicas de PCSK9. Por exemplo, uma molécula de ligação à PCSK9 pode inibir atividade proteolítica de PCSK9 (por exemplo, proteólise do pró-domínio de PCSK9) e/ou interação entre PCSK9 e receptor de PCSK9 (por exemplo, ligação de PCSK9 à LDL-R). PCSK9 sub-regula LDL-R de uma maneira pós-transcricional. Então, inibição de PCSK9 resulta em níveis de LDL-R aumentados. Níveis aumentados de LDL-R *in vivo* permitem absorção mediada por LDL-R aumentada de LDL-c. Então, moléculas de ligação que interferem com regulação de PCSK9 de LDL-R por fim reduzem níveis de LDL-c em circulação.

Moléculas de ligação à PCSK9 incluem, por exemplo, anticorpos que se ligam à PCSK9 (por exemplo, dentro de um domínio ou epitopo particular de PCSK9, tal como o domínio catalítico ou do domínio rico em cisteína) e polipeptídeos que incluem porções de ligação de antígeno de tais anticorpos. Moléculas de ligação à PCSK9 também incluem moléculas onde a porção de ligação não é derivada de um anticorpo, por exemplo, moléculas de ligação à PCSK9 derivadas de polipeptídios que têm uma dobra tipo imunoglobulina, e onde a porção de ligação de antígeno é projetada para se ligar à PCSK9 através de aleatorização, seleção e maturação de afinidade.

Deste modo, em um aspecto, a invenção refere-se a uma molécula de ligação à PCSK9 incluindo uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo que se liga (por exemplo, especificamente se liga) a uma PCSK9, onde a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro do domínio catalítico de PCSK9 humana (SEQ ID NO:1) dentro ou sobrepondo (por exemplo, compreendendo ou consistindo em todos ou uma porção) a um dos que seguem: (a) aminoácidos 166-177 de SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: YRA-DEYQPPDGG (SEQ ID NO:4); (b) aminoácidos 187-202 da SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: TSIQSD-HREIEGRVMV (SEQ ID NO:5)); (c) aminoácidos 206-219 da SEQ ID NO:1

(isto é, um epitopo dentro ou e sobrepondo à sequência que segue: ENV-PEEDGTRFHRQ (SEQ ID NO:6); (d) aminoácidos 231-246 de SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: AGVVS-GRDAGVAKGAS (SEQ ID NO:7)); (e) aminoácidos 277-283 da SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: VQPVGPL (SEQ ID NO:8)); (f) aminoácidos 336-349 da SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: VGAT-NAQDQPVTLG (SEQ ID NO:9)); (g) aminoácidos 368-383 da SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: II-GASSDCSTCFVSQS (SEQ ID NO:10)); ou (h) aminoácidos 426-439 da SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: EAWFPEDQRVLTPN (SEQ ID NO:11)).

Por exemplo, a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 166-171, 169-174 ou 172-177 da SEQ ID NO:1; a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 187-193, 191-196, 194-199 ou 197-202 da SEQ ID NO:1; a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 206-211, 209-214, 212-217, 215-219 da SEQ ID NO:1; a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 231-237, 235-240, 238-243, 241-246 da SEQ ID NO:1; a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 277-282 ou 279-283 da SEQ ID NO:1; a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 336-341, 339-343, 341-346 ou 344-349 da SEQ ID NO:1; a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 368-374, 372-377, 375-380 ou 378-383 da SEQ ID NO:1, a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 426-431, 429-434, 432-437 ou 435-439 da SEQ ID NO:1).

Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma molécula de ligação à PCSK9 isolada compreendendo uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo que se liga (por exemplo, se liga especificamente a uma PCSK9, onde a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro do domínio rico em cisteína de PCSK9 humana dentro ou sobrepondo a um

dos que seguem: (a) aminoácidos 443-500 da SEQ ID NO:1; (b) aminoácidos 557-590; ou (c) aminoácidos 636-678.

Em várias modalidades, a porção de ligação de antígeno se liga especificamente a um epitopo de PCSK9 humana dentro ou sobrepondo dentro ou sobrepondo a um dos que seguem: (a) aminoácidos 443-458 da SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: ALPPSTHGAGWQLFCR (SEQ ID NO:12)); (b) aminoácidos 459-476 da SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: TVWSAHS GPTRMATAIAR (SEQ ID NO:13)); (c) aminoácidos 486-500 da SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à seguinte sequência: CSSFSRSGKRRGERM (SEQ ID NO:14)); (d) aminoácidos 557-573 da SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: HVL TGCS SHWEVEDLGT (SEQ ID NO:15)); (e) aminoácidos 577-590 da SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: PVL RPRGQPNQCVG (SEQ ID NO:16)); (f) aminoácidos 636-645 da SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: SALPGTSHVL (SEQ ID NO:17)); (g) aminoácidos 659-677 da SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: RDVSTTGSTSEEAVTAVAI (SEQ ID NO:18)).

Por exemplo, a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 443-449, 447-452, 450-455, 453-458 da SEQ ID NO:1; a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 459-465, 463-468, 466-471, 469-474 ou 472-476 da SEQ ID NO:1; a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 486-491, 489-494, 492-497 ou 495-500 da SEQ ID NO:1; a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 557-563, 561-566, 564-569, 567-572 ou 569-573 da SEQ ID NO:1; a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 577-582, 580-585, 583-588 ou 586-590 da SEQ ID NO:1; a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 636-643 ou 640-645 da SEQ ID NO:1; a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 659-665, 663-668, 665-670, 668-673 ou 671-677 da SEQ

ID NO:1.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma molécula de ligação à PCSK9 isolada incluindo uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo que se liga (por exemplo, se liga especificamente a) a uma PCSK9, onde a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro do pró-domínio de PCSK9 humana dentro ou sobrepondo aos aminoácidos 89-134 da SEQ ID NO:1.

Em várias modalidades, a porção de ligação de antígeno se liga especificamente a um epitopo de PCSK9 humana dentro ou sobrepondo ao que segue: (a) aminoácidos 89-101 da SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: SQSERTARRLQAQ (SEQ ID NO:2)); ou (b) aminoácidos 106-134 da SEQ ID NO:1 (isto é, um epitopo dentro ou sobrepondo à sequência que segue: GYLTKILHVFHGLLPG-FLVKMSGDLLELA (SEQ ID NO:3)). Por exemplo, a porção de ligação de antígeno se liga especificamente a um epitopo dentro dos aminoácidos 123-131 da SEQ ID NO:1.

Por exemplo, a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 89-94, 92-97 ou 95-101 da SEQ ID NO:1; a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro dos aminoácidos 106-111, 109-114, 112-117, 115-120, 118-123, 121-126, 124-129 ou 127-134 da SEQ ID NO:1.

Em uma modalidade particular, a porção de ligação de antígeno se liga especificamente a um epitopo dentro do pró-domínio de PCSK9 humana dentro ou sobrepondo aos aminoácidos 101-107 da SEQ ID NO:1 (aminoácidos QAARRGY).

Em outra modalidade, a porção de ligação de antígeno se liga especificamente a um epitopo dentro do pró-domínio de PCSK9 dentro ou sobrepondo aos aminoácidos 123-132 da SEQ ID NO:1 (aminoácidos LVKMSGDLLE). Esses aminoácidos se encontram dentro dos aminoácidos 106-134 do pró-domínio de PCSK9 (SEQ ID NO:3; GYLTKILHVFHGLLPG-FLVKMSGDLLELA).

Em outra modalidade, a porção de ligação de antígeno se liga

especificamente à PCSK9 com os aminoácidos 101-132 da SEQ ID NO:1 (isto é, se liga a um epitopo dentro da SEQ ID NO:2, um epitopo dentro da SEQ ID NO:3 ou um epitopo que sobrepõe às SEQ ID NOs:2 e 3, isto é, inclui pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO:2 e da SEQ ID NO:3).

5 Em outra modalidade, a porção de ligação de antígeno se liga especificamente a uma PCSK9 dentro dos aminoácidos 101-132 da SEQ ID NO:1 e compreende pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO:2 (por exemplo, glutamina) e pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO:3 (por exemplo, glicina e/ou tirosina).

10 Em outra modalidade, a porção de ligação de antígeno se liga especificamente à PCSK9 dentro dos aminoácidos 101-132 da SEQ ID NO:1 e compreende pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO:2 (por exemplo, glutamina) e pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO:3 (por exemplo, glicina e/ou tirosina).

15 Em outra modalidade, a porção de ligação de antígeno se liga especificamente à PCSK9 em um epitopo que sobrepõe a pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO:2 (por exemplo, glutamina) e pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO:3 (por exemplo, glicina e/ou tirosina).

20 Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma molécula de ligação à PCSK9 isolada que compete em cruzamento (*cross-competing*) para ligação com qualquer uma das moléculas de ligação à PCSK9 acima mencionadas. Deste modo, tais moléculas de ligação de competição cruzada podem, por exemplo, interferir com ligação (por exemplo, de um anticorpo ou outra molécula de ligação à PCSK9 compreendendo uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo que se liga) a aminoácidos 101-107 ou 123-132 da SEQ ID NO:1 através de ligação a epitopos espacialmente próximos.

25 Em várias modalidades, a molécula de ligação à PCSK9 (por exemplo, a molécula de ligação à PCSK9 que se liga a um epitopo dentro do domínio catalítico, dentro do domínio rico em cisteína ou dentro do pró-domínio) é reativa cruzada com uma PCSK9 de um primata não-humano (por exemplo, um macaco cinomólogo ou um macaco *rhesus*). Em várias modalidades, a porção de ligação de antígeno é reativa cruzada com uma

30

PCSK9 de uma espécie de roedor (por exemplo, PCSK9 de murino, PCSK9 de rato).

Em várias modalidades, a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo linear.

- 5 Em várias modalidades, a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear. Em um exemplo, a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear incluindo, ou consistindo em, pelo menos uma porção de cada um dos epitopos lineares que seguem: (a) aminoácidos 89-101 da SEQ ID NO:1; e (b) aminoácidos 106-134 da SEQ ID NO:1. Em
- 10 outro exemplo, a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear incluindo, ou consistindo em, pelo menos uma porção de cada um dos epitopos lineares que seguem: (a) aminoácidos 166-177 da SEQ ID NO:1; e (b) aminoácidos 443-458 da SEQ ID NO:1. Em ainda outro exemplo, a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear incluindo, ou consistindo em, pelo menos uma porção de dois ou três dos epitopos lineares que seguem: (a) aminoácidos 187-202 da SEQ ID NO:1; (b) aminoácidos 231-246 da SEQ ID NO:1; e (c) aminoácidos 368-383 da SEQ ID NO:1. Em
- 15 outro exemplo, a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear incluindo, ou consistindo em, pelo menos uma porção de cada um dos epitopos lineares que seguem: (a) aminoácidos 206-219 da SEQ ID NO:1; e (b) aminoácidos 277-283 da SEQ ID NO:1. Em outro exemplo, a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear incluindo, ou consistindo em, pelo menos uma porção de cada um dos epitopos lineares que segue: (a) aminoácidos 336-349 da SEQ ID NO:1; e (b) aminoácidos 426-439 da
- 20 SEQ ID NO:1. Em outro exemplo, a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear incluindo, ou consistindo em, pelo menos uma porção de dois ou três dos epitopos lineares que seguem: (a) aminoácidos 459-476 da SEQ ID NO:1; (b) aminoácidos 486-500 da SEQ ID NO:1; e (c) aminoácidos 557-573 da SEQ ID NO:1. Em outro exemplo, a porção de ligação de
- 25 antígeno se liga a um epitopo não-linear incluindo, ou consistindo em, pelo menos uma porção de dois ou três dos epitopos lineares: (a) aminoácidos 577-590 da SEQ ID NO:1; (b) aminoácidos 636-645 da SEQ ID NO:1; e (c)
- 30

aminoácidos 659-677 da SEQ ID NO:1.

Em uma modalidade particular, a porção de ligação de antígenos e liga a um epitopo não-linear (por exemplo, um epitopo conformacional) compreendendo todos ou uma porção de (a) aminoácidos 101-107 da SEQ ID NO:1; e (b) aminoácidos 123-132 da SEQ ID NO:1.

Em várias modalidades, a eficácia de ligação das moléculas de ligação à PCSK9 se relaciona com a localização de ligação dentro de um domínio particular ou epitopo de PCSK9.

Em várias modalidades, a porção de ligação de antígeno da molécula de ligação à PCSK9 se liga à PCSK9 com uma constante de dissociação (K_D) igual a ou menos do que 10 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,25 nM ou 0,1 nM.

Em várias modalidades, a porção de ligação de antígeno da molécula de ligação à PCSK9 se liga à PCSK9 de um primata não-humano (por exemplo, macaco cinomólogo ou chimpanzé) com uma K_D igual a ou menos do que 0,3 nM.

Em várias modalidades, a porção de ligação de antígeno se liga à PCSK9 de camundongo com uma K_D igual a ou menos do que 0,5 nM.

O anticorpo pode ser um anticorpo quimérico (por exemplo, humanizado) ou um anticorpo humano ou anticorpo humanizado.

Em outra modalidade, a porção de ligação de antígeno é uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo humano.

A porção de ligação de antígeno pode ser uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo monoclonal ou um anticorpo policlonal.

A molécula de ligação à PCSK9 inclui, por exemplo, um fragmento Fab, um fragmento Fab', um $F(ab')_2$, ou um fragmento Fv do anticorpo.

Em uma modalidade, a molécula de ligação à PCSK9 é um anticorpo humano.

Em uma modalidade, a molécula de ligação à PCSK9 inclui um Fv de cadeia simples.

Em uma modalidade, a molécula de ligação à PCSK9 inclui um diacorpo (por exemplo, um diacorpo de cadeia simples ou um diacorpo tendo

duas cadeias de polipeptídeo).

Em algumas modalidades, a porção de ligação de antígeno do anticorpo é derivada de um anticorpo de um dos isotipos que seguem: IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em algumas modalidades, a porção de ligação de antígeno do anticorpo é derivada de um anticorpo do isotipo IgA ou IgE

A molécula de ligação à PCSK9 (por exemplo, a molécula de ligação à PCSK9 que se liga a um epitopo dentro do domínio catalítico, dentro do domínio rico em cisteína ou dentro do pró-domínio) pode exibir uma ou mais de várias atividades biológicas. Em várias modalidades, a molécula de ligação à PCSK9 inibe ligação de PCSK9 a um ligante de PCSK9. Em algumas modalidades, a molécula de ligação à PCSK9 inibe ligação a ligante de PCSK9 em pH 7-8. Em algumas modalidades, a molécula de ligação à PCSK9 inibe ligação em um pH abaixo de pH 7 (por exemplo, em pH 5-7). Por exemplo, a molécula de ligação à PCSK9 inibe ligação de PCSK9 ao ligante de PCSK9 em pelo menos 5%, 10%, 15%, 25% ou 50% com relação a um controle (por exemplo, com relação à ligação na ausência da molécula de ligação de PCSK9).

Por exemplo, a molécula de ligação à PCSK9 pode inibir ligação de PCSK9 a um receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-R) (por exemplo, a molécula de ligação à PCSK9 inibe ligação de PCSK9 a LDL-R em pH 7 e pH menor, por exemplo, pH 5-7).

O pró-domínio de PCSK9 é clivado a partir do, e permanece não-covalentemente associado com o, polipeptídeo de PCSK9 maduro. Em uma modalidade, uma molécula de ligação à PCSK9 compete com um pró-domínio de PCSK9 para ligação ao domínio catalítico ou rico em cisteína (ou vice-versa) e inibe uma atividade biológica de PCSK9.

Em algumas modalidades, a molécula de ligação à PCSK9 inibe atividade proteolítica de PCSK9 (por exemplo, proteólise do pró-domínio de PCSK9 ou de outro substrato de PCSK9). Por exemplo, a molécula de ligação à PCSK9 inibe a atividade proteolítica de PCSK9 em pelo menos 5%, 10%, 15%, 25% ou 50%, com relação a um controle (por exemplo, com relação à atividade na ausência da molécula de ligação à PCSK9).

Em algumas modalidades, a molécula de ligação à PCSK9 inibe uma diminuição dependente de PCSK9 de LDL-R (por exemplo, degradação dependente de PCSK9 de LDL-R) em uma célula, por exemplo, um hepatócito. Por exemplo, a molécula de ligação à PCSK9 inibe uma diminuição dependente de PCSK9 de LDL-R em pelo menos 5%, 10%, 15%, 25% ou 50% com relação a um controle (por exemplo, com relação à diminuição de LDL-R na ausência da molécula de ligação de PCSK9). Nessas modalidades, um aumento no nível de LDL-R indica que a molécula de ligação à PCSK9 inibe a diminuição dependente de PCSK9 de LDL-R.

Em certas modalidades, uma molécula de ligação à PCSK9, quando contatada com uma célula, por exemplo, um hepatócito, sob condições onde PCSK9 está presente, aumenta a absorção de LDL-c pelo hepatócito, com relação à absorção de LDL-C pelo hepatócito na ausência da molécula de ligação de PCSK9. Por exemplo, a molécula de ligação à PCSK9 aumenta a absorção de LDL-c em pelo menos 5%, 10%, 15%, 25% ou 50%, com relação a um controle (por exemplo, com relação à ligação na ausência de molécula de ligação de PCSK9).

A molécula de ligação à PCSK9 pode se ligar à PCSK9 na presença de LDL-c e/ou ela pode se ligar à PCSK9 na presença de soro (por exemplo, na presença de pelo menos 1%, 5%, 10%, 25% ou 50% de soro).

A invenção refere-se também a moléculas de ligação à PCSK9 de não-anticorpo. Uma molécula de ligação à PCSK9 de não-anticorpo inclui um domínio de ligação à PCSK9 que tem uma sequência de aminoácido derivada de uma dobra tipo imunoglobulina (tipo Ig) de um polipeptídeo de não-anticorpo, tal como um dos que seguem: tenascina, N-caderina, E-caderina, ICAM, titina, receptor de GCSF, receptor de citocina, inibidor de glicosidase, cromoproteína antibiótica, molécula de adesão à membrana mielina P0, CD8, CD4, CD2, MHC de classe 1, receptor de antígeno de célula T, domínio SET CD1, CD2 e I de VCAM, domínio de imunoglobulina SET I da proteína de ligação da miosina, domínio da imunoglobulina SET I da proteína de ligação à miosina H, domínio de imunoglobulina SET I de "telokin", NCAM, "twitchin", neuróglio, receptor de hormônio do crescimento, receptor de eri-

tropoietina, receptor da prolactina, receptor de interferon-gama, β -galactosidase/glucuronidase, β -glucuronidase, transglutaminase, receptor de antígeno de célula T, superóxido dismutase, domínio de fator de tecido, citocroma F, proteína fluorescente verde, GroEL ou taumatina. Em geral, a sequência de aminoácido do domínio de ligação à PCSK9 é alterado, com relação à sequência de aminoácido da dobra do tipo imunoglobulina, de modo que o domínio de ligação à PCSK9 especificamente se liga à PCSK9 (isto é, onde a dobra do tipo imunoglobulina não se liga especificamente à PCSK9).

Em várias modalidades, a sequência de aminoácido do domínio de ligação à PCSK9 é pelo menos 60% idêntica (por exemplo, pelo menos 65%, 75%, 80%, 85% ou 90% idêntica) a uma sequência de aminoácido de uma dobra do tipo imunoglobulina de uma fibronectina, um receptor de citocina ou uma caderina.

Em várias modalidades, a sequência de aminoácido do domínio de ligação à PCSK9 é pelo menos 60%, 65%, 75%, 80%, 85% ou 90% idêntica a uma sequência de aminoácido de uma dobra do tipo imunoglobulina de um dos que seguem: tenascina, N-caderina, E-caderina, ICAM, titina, receptor de GCSF, receptor de citocina, inibidor de glicosidase, cromoproteína antibiótica, molécula de adesão à membrana da mielina P0, CD8, CD4, CD2, MHC classe I, receptor de antígeno de célula T, domínios SET CD1, CD2 e I de VCAM-1, domínio de imunoglobulina SET I da proteína de ligação da micina C, domínio de imunoglobulina SET I da proteína de ligação à miosina H, domínio de imunoglobulina SET I de "telokin", NCAM, "twitchin", neurógliia, receptor de hormônio do crescimento, receptor de eritropoietina, receptor de prolactina, receptor de interferon-gama, β -galactosidase/glucuronidase, β -glucuronidase, transglutaminase, receptor de antígeno de célula T, superóxido dismutase, domínio de fator de tecido, citocroma F, proteína fluorescente verde, GroEL ou traumatina.

Em várias modalidades, o domínio de ligação à PCSK9 se liga à PCSK9 com uma K_D igual a ou menos do que 10 nM (por exemplo, 1 nM, 0.5 nM, 0.1 nM).

Em algumas modalidades, a dobra tipo Ig é uma dobra tipo Ig de

uma fibronectina, por exemplo, uma dobra tipo Ig de fibronectina tipo III (por exemplo, uma dobra tipo Ig de módulo 10 de fibronectina III).

A invenção também provê peptídeos correspondendo a epitopos antigênicos de PCSK9. Em um aspecto, a invenção refere-se a um peptídeo consistindo em uma sequência de aminoácido pelo menos 90% idêntica a uma das sequências de aminoácido que seguem: YRADEYQPPDGG (SEQ ID NO:4); TSIQSDHREIEGRVMV (SEQ ID NO:5); ENVPEEDGTRFHRQ (SEQ ID NO:6); AGVVSGRDAGVAKGAS (SEQ ID NO:7); VQPVGPL (SEQ ID NO:8); VGATNAQDQPVTLG (SEQ ID NO:9); IIGASSDCSTCFVSQS (SEQ ID NO:10); EAWFPEDQRVLTPN (SEQ ID NO:11); ALPPSTHGAGWQLFCR (SEQ ID NO:12); TVWSAHSGPTRMATAIAR (SEQ ID NO:13); CSSFSRSGKRRGERM (SEQ ID NO:14); HVLTCSSHWEVEDLGT (SEQ ID NO:15); PVLPRGQPNQCVG (SEQ ID NO:16); SALPGTSHVL (SEQ ID NO:17); RDVSTTGSTSEEAVTAVAI (SEQ ID NO:18); SQSERTARRLQAQ (SEQ ID NO:2); ou GYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELA (SEQ ID NO:3).

Em outro aspecto, a invenção provê composições para eliciação de anticorpo que se ligam especificamente à PCSK9 quando a composição é administrada a um animal. A composição inclui, por exemplo, um dos peptídeos que seguem: YRADEYQPPDGG (SEQ ID NO:4); TSIQSDHREIEGRVMV (SEQ ID NO:5); ENVPEEDGTRFHRQ (SEQ ID NO:6); AGVVSGRDAGVAKGAS (SEQ ID NO:7); VQPVGPL (SEQ ID NO:8); VGATNAQDQPVTLG (SEQ ID NO:9); IIGASSDCSTCFVSQS (SEQ ID NO:10); EAWFPEDQRVLTPN (SEQ ID NO:11); ALPPSTHGAGWQLFCR (SEQ ID NO:12); TVWSAHSGPTRMATAIAR (SEQ ID NO:13); CSSFSRSGKRRGERM (SEQ ID NO:14); HVLTCSSHWEVEDLGT (SEQ ID NO:15); PVLPRGQPNQCVG (SEQ ID NO:16); SALPGTSHVL (SEQ ID NO:17); RDVSTTGSTSEEAVTAVAI (SEQ ID NO:18); SQSERTARRLQAQ (SEQ ID NO:2); ou GYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELA (SEQ ID NO:3); um peptídeo da mesma com menos do que 5 mudanças de aminoácido; ou um fragmento da mesma (por exemplo, fragmentos contendo 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 aminoácidos). O peptídeo pode ser modificado para aumentar a anti-

genicidade, por exemplo, através de acoplamento a uma proteína carreadora.

A invenção refere-se também a uma composição farmacêutica que inclui uma molécula de ligação à PCSK9 descrita aqui. A composição
5 inclui, por exemplo, uma molécula de ligação à PCSK9 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

A invenção refere-se também a métodos de uso de moléculas de ligação à PCSK9 descritas aqui.

Por exemplo, em um aspecto, a invenção refere-se a um método
10 de aumento dos níveis de LDL-R em uma célula, por exemplo, um hepatócito. O método inclui contato do hepatócito com uma molécula de ligação à PCSK9 (por exemplo, uma molécula de ligação à PCSK9 incluindo uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo que se liga especificamente a uma PCSK9), deste modo reduzindo a sub-regulagem de LDL-R pela
15 PCSK9 e aumentando os níveis de LDL-R no hepatócito.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método de aumento da absorção de LDL-c por uma célula, por exemplo, um hepatócito. O método inclui contato do hepatócito com uma molécula de ligação à PCSK9 (por exemplo, uma molécula de ligação à PCSK9 incluindo uma porção de
20 ligação de antígeno de um anticorpo que se liga especificamente a uma PCSK9), deste modo reduzindo a sub-regulagem de LDL-R por PCSK9 e aumentando a absorção de LDL-c pelo hepatócito.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método de modulação de atividade de PCSK9 em um indivíduo. O método inclui administrar
25 ao indivíduo uma molécula de ligação à PCSK9 (por exemplo, uma molécula de ligação à PCSK9 incluindo uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo que se liga especificamente a uma PCSK9) que modula uma atividade biológica da PCSK9. A molécula de ligação à PCSK9 exibe uma ou mais das atividades que seguem: (a) inibição da ligação de PCSK9 a uma LDL-R;
30 (b) inibição da atividade proteolítica da PCSK9; (c) inibição da diminuição dependente de PCSK9 de LDL-R em um hepatócito; e (d) inibição da degradação dependente de PCSK9 de LDL-R em células hepáticas.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método de redução de colesterol no plasma em um indivíduo. O método inclui administrar ao indivíduo uma composição farmacêutica incluindo uma molécula de ligação à PCSK9 descrita aqui em uma quantidade eficaz para reduzir colesterol no plasma no indivíduo. A quantidade pode ser uma quantidade eficaz para reduzir LDL-c. A concentração de LDL-c no plasma do indivíduo pode ser reduzida em pelo menos 5%, com relação ao LDL-c no plasma antes da administração da composição (por exemplo, a concentração de LDL-c no plasma é reduzida em pelo menos 10%, 15% ou 20%). Em algumas modalidades, o indivíduo também está recebendo terapia com um segundo agente de redução de colesterol, tal como uma estatina.

Em várias modalidades, o indivíduo tem, ou está sob risco de, um distúrbio de lipídeo (por exemplo, hiperlipidemia, hiperlipidemia tipo I, tipo II, tipo III, tipo IV ou tipo V, hipertrigliceridemia secundária, hipercolesterolemia, xantomatose, deficiência de colesterol acetiltransferase). Por exemplo, o indivíduo é hipercolesterolêmico ou está sob risco de hipercolesterolemia; o indivíduo tem, ou está sob risco de, aterosclerose; o indivíduo tem ou está sob risco de, um distúrbio cardiovascular.

Em algumas modalidades, o indivíduo é intolerante à estatina (por exemplo, o indivíduo sofre de efeitos colaterais adversos quando toma um fármaco de estatina) e/ou o indivíduo é resistente à terapia com estatina (por exemplo, a terapia com estatina não causa redução de colesterol no indivíduo).

Em algumas modalidades, o nível de colesterol no plasma total do indivíduo é 200 mg/dl ou mais, antes da administração da composição.

Em algumas modalidades, o nível de LDL-c no plasma do indivíduo é 160 mg/dl ou mais, antes da administração da composição.

Em algumas modalidades, a composição é administrada intravenosamente.

Em algumas modalidades, as moléculas de ligação à PCSK9 podem ser usadas para preparar um medicamento para o tratamento de doença associada com níveis de colesterol altos.

Os detalhes de uma ou mais modalidades da invenção são mostrados nos desenhos acompanhantes e no relatório descritivo abaixo. Outras características, objetivos e vantagens da invenção serão aparentes a partir do relatório descritivo e desenho e a partir das reivindicações.

5 Descrição dos Desenhos

A FIGURA 1 é um diagrama esquemático de PCSK9 humana, indicando a localização do peptídeo de sinal, pró-domínio, domínio catalítico e domínio C-terminal (rico em cisteína) na sequência linear.

10 A FIGURA 2 é uma mostra de um modelo estrutural tridimensional de PCSK9 humana. Os números indicam a localização de epítopos listados na Tabela 2.

A FIGURA 3 mostra os resultados dos estudos de afinidade de ligação Biacore de H1-Fab se ligando à PCSK9. Os sensogramas (linhas pretas denteadas) são as curvas de ligação de H1-Fab em concentrações de 0,78,
15 1,56, 3,12, 6,25 e 12,5 nM. O ajuste global 1:1 (linhas pretas lisas) dá os parâmetros de ligação que seguem: $k_d = 3,41 \times 10^{-3}$ (1/s), $k_a = 3,23 \times 10^5$ (1/Ms) e $K_D = 1,05 \times 10^{-8}$ (M).

20 As FIGURAS 4A-C ilustram que H1-Fab pode (4A) romper a interação hPCSK9/LDL-R e levar a (4B) níveis de LDL-R na superfície aumentados e (4C) absorção de LDL aumentada por células HepG2.

25 As FIGURAS 5A-C mostram o esquema de conexão de fluido de um sistema de espectrometria de massa de troca de deutério automático (DXMS). Posições de válvula para fase de proteólise de carregamento/em linha, estágio de dessalinização e estágio de separação do experimento são ilustradas nas FIGURAS 5A, 5B e 5C, respectivamente.

A FIGURA 6 é um esquema mostrando os experimentos de troca de Hidrogênio/Deutério (H/D) complementares (isto é, experimentos de proteção, controle e In-D₂O) e resultados esperados.

30 As FIGURAS 7A-B mostram a mudança observada em deuteração como uma função de número de resíduo de hPCSK9 para (A) os experimentos de proteção e (B) os experimentos In-D₂O realizados em hPCSK9 e complexo hPCSK9:H1.

A FIGURA 8 mostra o desenho da estrutura de cristal de hPCSK9 com as duas extensões de aminoácido (isto é, resíduos de aminoácido 101-107 (QAARRGY) e 123-132 (LVKMSGDLLE)) previstas para formar um epítipo não-linear.

5 Descrição Detalhada

A presente invenção provê moléculas que se ligam à PCSK9 ("moléculas de ligação à PCSK9"), particularmente anticorpos humanos e porções dos mesmos que se ligam à PCSK9 humana e modulam suas funções. Epítopos de PCSK9 e agentes que se ligam a esses epítopos são também providos aqui.

A sequência de comprimento completo de PCSK9 humana (hPCSK9) é encontrada sob o Número de Acesso Genbank® GI: 119627065, gb|EAX06660.1, e é mostrada na Tabela 1 como SEQ ID NO:1. Uma sequência de mRNA codificando hPCSK9 é encontrada sob o Número de Acesso GI: 31317306, NM_174936.

Tabela 1. Sequência de Aminoácido de PCSK9 Humana

MGTVSSRRS⁵WWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDG
 LAEAP¹⁰EHGTTATFHRC¹⁵AKDPWRLPGTYVV²⁰LKEETHLSQSERTARRLQAQA
 ARRGYLTKILHVFHGLLP²⁵GFLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIP
 WNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD³⁰FE
 NVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNC
 QGKGTVSGTLIGLEFIRKSQ³⁵LVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARA
 GVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRC
 VDLFAPGEDII⁴⁰GASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAE
 LRQRLIHFS⁴⁵AKDVINEAWFPEDQ⁵⁰RVLTPNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVW
 SAHSGPTRMATAIARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLV⁵⁵CRA
 HNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPP⁶⁰AEASMGTRVHCHQQGHVLTG
 CSSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQC⁶⁵VGHREASIHASCCHAPGLECKV
 KEHGIPAPQE⁷⁰QVTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDV
 STTGSTSEEAVTAVAICCRSRHLA⁷⁵QASQELQ (SEQ ID NO:1)

As localizações do peptídeo de sinal, pró-domínio, domínio catalítico e domínio rico em cisteína C-terminal na sequência linear de SEQ ID

NO:1 são mostradas na FIGURA 1. PCSK9 humana é N-glicosilada em N533. Ela é sulfatada em Y53 e no domínio catalítico (protease). A concentração de hPCSK9 em plasma humano varia de a partir de 50-600 ng/ml (Lagace e outros, 2006, *J. Clin. Inv.* 116(11):2995-3005). Certas mutações em hPCSK9 estão associadas com níveis no plasma elevados e reduzidos de LDL-c (Horton e outros, 2006 *Trends. Biochem. Sci.* 32(2):71-77). As mutações que seguem estão associadas com LDL-c elevada: S127R, F216L, D374Y, N425S e R496W. As mutações que seguem estão associadas com LDL-c reduzida: R46L, Δ R97, G106R, Y142Y, L253F, A443T e C679X.

10 Sequências de aminoácido de PCSK9 de chimpanzé previstas são encontradas no Genbank[®] sob No. de Acesso GI: 114556790, XP_001154126; e No. de Acesso GI:114556788, XP_513430. A sequência de aminoácido de PCSK9 de camundongo é encontrada sob No. de Acesso GI:23956352, NP_705793. A sequência de aminoácido de PCSK9 de rato é encontrada sob No. de Acesso GI:77020250, NP_954862. A sequência de aminoácido de hPCSK9 é 98,7% idêntica à PCSK9 de chimpanzé, 79,5% idêntica à PCSK9 de rato e 78,9% idêntica à PCSK9 de camundongo.

15 As sequências de aminoácido de epitopos de antígeno de hPCSK9 e sua posição dentro da sequência de hPCSK9 da SEQ ID NO:1 são listadas na Tabela 2.

20 Tabela 2. Epitopos antigênicos de hPCSK9

No.	sequência de aminoácido	SEQ ID NO:	domínio	posição
1	SQSERTARRLQAO	2	Pro	89-101
2	GYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDL-LELA	3	Pro	106-134
3	YRADEYQPPDGG	4	Cat	166-177
4	TSIQSDHREIEGRVMV	5	Cat	187-202
5	ENVPEEDGTRFHRQ	6	Cat	206-219
6	AGVVSGRDAGVAKGAS	7	Cat	231-246
7	VQPVGPL	8	Cat	277-283
8	VGATNAQDQPVTLG	9	Cat	336-349
9	IIGASSDCSTCFVSQS	10	Cat	368-383

10	EAWFPEDQRVLTPN	11	Cat	426-439
11	ALPPSTHGAGWQLFCR	12	cat/crd	443-458
12	TVWSAHS GPTRMATAIAR	13	Crd	459-476
13	CSSFSRSGKRRGERM	14	Crd	486-500
14	HVLTGCSSHWEVEDLGT	15	Crd	557-573
15	PVLRPRGQPNQCVG	16	Crd	577-590
16	SALPGTSHVL	17	Crd	636-645
17	RDVSTTGSTSEEAVTAVAI	18	Crd	659-677

pro=pró-domínio, cat=domínio catalítico, crd=domínio rico em cisteína

A FIGURA 2 é uma mostra de um modelo estrutural tridimensional de hPCSK9. Os conjuntos de epitopos lineares que seguem são próximos no modelo tridimensional: região 1 no pró-domínio (SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:3); região 2 no domínio catalítico e no domínio catalítico/rico em cisteína (SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:12); região 3 no domínio catalítico (SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 e SEQ ID NO:10); região 4 no domínio catalítico (SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:8); região 5 no domínio catalítico (SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:11); região 6 no domínio rico em cisteína (SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 e SEQ ID NO:15); e região 7 no domínio rico em cisteína (SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:18).

Resíduos de aminoácidos nesses conjuntos de epitopos formam epitopos não-lineares.

O termo "anticorpo" conforme aqui usado refere-se a um anticorpo intacto ou um fragmento de ligação de antígeno (isto é, "porção de ligação de antígeno") ou cadeia simples (isto é, cadeia leve ou pesada) do mesmo. Um anticorpo intacto é uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (abreviada aqui como V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve (abreviada aqui como V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é compreendida de um domi-

nio, C_L . As regiões V_H e V_L podem ser subdivididas mais em regiões de hipervariabilidade, chamadas regiões de determinação de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, chamadas regiões de estrutura principal (FR). Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro FRs dispostas do terminal amino para terminal carbóxi na ordem que segue: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina a tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema de complemento clássico.

O termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo, conforme aqui usado, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo intacto que retêm a habilidade em especificamente se ligarem a um dado antígeno (por exemplo, hPCSK9). Funções de ligação de antígeno de um anticorpo podem ser realizadas por fragmentos de um anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de ligação compreendidos dentro do termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo incluem um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo em domínios V_L , V_H e CH_1 ; um fragmento $F(ab)_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab (geralmente um de uma cadeia pesada e um de uma cadeia leve) ligados por uma ponte dissulfeto na região conectora; e fragmento Fd consistindo nos domínios V_H e CH_1 ; um fragmento Fv consistindo nos domínios V_L e V_H de um braço único de um anticorpo; um fragmento de anticorpo de domínio simples (dAb) (Ward e outros, 1989 *Nature* 341:544-546), que consiste em um domínio V_H ; e uma região de determinação de complementaridade isolada (CDR).

Ainda, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H , sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, através de um ligante de peptídeo artificial que permite que eles sejam feitos como uma cadeia de proteína única onde as regiões V_L e V_H emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecido como Fv de cadeia única (scFv); vide, por exemplo, Bird e outros, 1988 *Science*

242:423-426; e Huston e outros, 1988 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883). Tais anticorpos de cadeia única incluem uma ou mais "porções de ligação de antígeno" de um anticorpo. Esses fragmentos de anticorpo são obtidos usando técnicas convencionais conhecidas daqueles versados na técnica, e os fragmentos são avaliados quanto à atividade da mesma maneira que os anticorpos intactos.

Porções de ligação de antígeno podem ser também incorporadas a anticorpos de domínio único, maxicorpos, minicorpos, intracorpos, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, v-NAR e bis-scFv (vide, por exemplo, Hollinger e Hudson, 2005, *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1126-1136). Porções de ligação de antígeno de anticorpos podem ser enxertadas em *molécula matriz* ("scaffolds") baseados em polipeptídeos tal como Fibronectina tipo III (Fn3) (vide Patente U.S. No. 6.703.199, que descreve monocorpos de polipeptídeo de fibronectina).

Porções de ligação de antígeno podem ser incorporadas a moléculas de cadeia única compreendendo um par de segmentos Fv em tandem (V_H -CH1- V_H -CH1) que, junto com polipeptídeos de cadeia leve complementares, formam um par de regiões de ligação de antígeno (Zapata e outros, 1995, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062; e Patente U.S. No. 5.641.870).

Uma "molécula de ligação à PCSK9 isolada", conforme aqui usado, refere-se a uma molécula de ligação que é substancialmente livre de moléculas tendo especificidades antigênicas para antígenos outros que não PCSK9 (por exemplo, um anticorpo isolado que especificamente se liga à hPCSK9 é substancialmente livre de anticorpos que se ligam especificamente a antígenos outros que não hPCSK9). Uma molécula de ligação isolada que se liga especificamente à hPCSK9 pode no entanto, ter reatividade cruzada para outros antígenos, tal como moléculas PCSK9 de outras espécies. Uma molécula de ligação é "purificada" se ela for substancialmente livre de material celular.

O termo "composição de anticorpo monoclonal" conforme aqui usado refere-se a uma preparação de moléculas de anticorpo de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal mostra es-

pecificidade e afinidade de ligação únicas para um epítipo particular.

O termo "anticorpo humano", conforme aqui usado, pretende incluir anticorpo tendo regiões variáveis onde ambas a estrutura principal e as regiões CDR são derivadas de sequências de origem humana. Ainda, se o anticorpo contiver uma região constante, a região constante é também derivada de tais sequências humanas, por exemplo, sequências de linha germinativa humana, ou versões mutadas de sequências de linha germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não-codificados por sequências humanas (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica de sítio *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*). No entanto, o termo "anticorpo humano", conforme usado aqui, não pretende incluir anticorpos onde sequências de CDR derivadas da linha germinativa de outras espécies de mamífero, tal como camundongo, foram enxertadas em sequências de estrutura principal humana.

O termo "anticorpo monoclonal humano" refere-se a um anticorpo mostrando uma especificidade de ligação única que tem regiões variáveis onde ambas a estrutura principal e as regiões de CDR são derivadas de sequências humanas. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal humano é produzido por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não-humano transgênico (por exemplo, um camundongo transgênico tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada e um transgene de cadeia leve humano) fundida a uma célula imortalizada.

O termo "anticorpo humano recombinante", conforme aqui usado, inclui qualquer anticorpo humano que é preparado, expresso, criado ou isolado através de meios recombinantes, tal como um anticorpo isolado de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico ou transcromossomal para genes da imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado a partir dele; um anticorpo isolado de uma célula hospedeiro transformada para expressar o anticorpo humano, por exemplo, de um transfectoma; um anticorpo isolado de uma biblioteca de anticorpo humano combinatorial, recombinante; e um anticorpo preparado, expresso, criado ou isolado atra-

vés de outros meios que envolvem união de toda ou uma porção de uma sequência de gene da imunoglobulina humana com outra sequência de DNA. Tais anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis onde a estrutura principal e regiões de CDR são derivadas de sequências de imunoglobulina de linha germinativa humana. Em certas modalidades, no entanto, tais anticorpos humanos recombinantes podem ser submetidos à mutagênese *in vitro* (ou, quando um animal transgênico para sequências Ig humanas for usado, mutagênese somática *in vivo*) e então as sequências de aminoácido das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas de e relacionadas com sequências V_H e V_L da linha germinativa humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório da linha germinativa de anticorpo humano em um humano.

Conforme aqui usado, "isotipo" refere-se à classe de anticorpo (por exemplo, IgM, IgE, IgG tal como IgG1 ou IgG4) que é codificado pelo gene de região constante de cadeia pesada.

As expressões "um anticorpo reconhecendo um antígeno" e "um anticorpo específico para um antígeno" são usadas intercomutavelmente aqui com o termo "um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno".

Conforme aqui usado, uma molécula de ligação à PCSK9 (por exemplo, um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo) que "especificamente se liga à PCSK9" pretende se referir a uma molécula de ligação à PCSK9 que se liga à PCSK9 com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos. Uma molécula de ligação à PCSK9 (por exemplo, um anticorpo) que "reage com cruzamento com um antígeno" pretende se referir a uma molécula de ligação à PCSK9 que liga esse antígeno com uma K_D de 1×10^{-6} M ou menos. Uma molécula de ligação à PCSK9 (por exemplo, um anticorpo) que "não reage com cruzamento" com um dado antígeno pretende se referir a uma molécula de ligação à PCSK9 que não se liga detectavelmente ao dado antígeno ou se liga com uma K_D de 1×10^{-5} M ou mais. Em certas modalidades, tais moléculas de ligação que não reagem com cruzamento com o antígeno exibem ligação essencialmente não-detectável contra essas proteínas em ensaios de ligação padrão.

Conforme aqui usado, o termo "alta afinidade", quando se referindo a um anticorpo IgG, indica que o anticorpo tem uma K_D de 10^{-9} M ou menos para um antígeno alvo.

5 Conforme aqui usado, o termo "um epitopo dentro ou sobrepondo a" resíduos de aminoácido particulares refere-se a um epitopo que compreende, consiste em ou sobrepõe a todos ou uma porção de tais resíduos.

10 O termo "epitopo" ou "determinante antigénico" refere-se a um sítio em um antígeno ao qual uma molécula de ligação à PCSK9 da invenção se liga especificamente. Epitopos podem ser formados ambos a partir de aminoácidos contíguos ou aminoácidos não-contíguos justapostos por dobra terciária de uma proteína. Epitopos formados de aminoácidos contíguos são tipicamente retidos em exposição a solventes desnaturantes, enquanto epitopos formados por dobra terciária são tipicamente perdidos em tratamento com solventes desnaturantes. Um epitopo inclui tipicamente pelo menos 3,
15 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 aminoácidos em uma conformação espacial única. Métodos de determinação de conformação espacial de epitopos incluem técnicas no campo e aqueles descritos aqui, por exemplo, cristalografia de raio X e ressonância magnética nuclear 2 dimensional (vide, por exemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol.
20 66, G.E. Morris, Ed. (1996)).

Também compreendidas pela presente invenção são moléculas de ligação à PCSK9 que se ligam ao (isto é, reconhecem) mesmo epitopo que as moléculas de ligação à PCSK9 descritas aqui. Moléculas de ligação à PCSK9 que se ligam ao mesmo epitopo podem ser identificadas por sua habilidade em competir com cruzamento com (isto é, competitivamente inibir
25 ligação de) uma molécula de ligação à PCSK9 de referência para um antígeno alvo de uma maneira estatisticamente significativa. Inibição competitiva pode acontecer, por exemplo, se as moléculas de ligação à PCSK9 se ligarem a epitopos idênticos ou estruturalmente similares (por exemplo, epitopos de sobreposição) ou epitopos espacialmente proximais que, quando ligados,
30 causa impedimento estérico entre os anticorpos.

Inibição competitiva pode ser determinada usando ensaios de

- rotina onde a molécula de ligação à PCSK9 sob teste inibe ligação específica de uma molécula de ligação à PCSK9 de referência a um antígeno comum. Vários tipos de ensaios de ligação competitiva são conhecidos, por exemplo: radioimunoensaio direto ou indireto em fase sólida (RIA), imunoensaio de enzima direto ou indireto em fase sólida (EIA), ensaio de competição sanduíche (vide Stahlí e outros, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA de biotina-avidina direto em fase sólida (vide Kirkland e outros, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensaio rotulado direto de fase sólida, ensaio sanduíche rotulado direto de fase sólida (vide Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); RIA de rotulação direta em fase sólida usando rotulador I-125 (vide Morel e outros, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988); EIA de biotina-avidina direto em fase sólida (Cheung e outros, *Virology* 176:546 (1990)); e RIA rotulado direto (Moldenhauer e outros, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Tipicamente, tal ensaio envolve o uso de antígeno purificado ligado a uma superfície sólida ou células carregando qualquer um desses, uma molécula de ligação à PCSK9 de teste não-rotulada e uma molécula de ligação à PCSK9 de referência rotulada. Inibição competitiva é medida através da determinação da quantidade de rotulador ligado à superfície sólida ou células na presença da molécula de ligação à PCSK9 de teste. Geralmente a molécula de ligação à PCSK9 de teste está presente em excesso. Geralmente, quando uma molécula de ligação à PCSK9 de competição está presente em excesso, ela vai inibir ligação específica de uma molécula de ligação à PCSK9 de referência a um antígeno comum em pelo menos 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% ou mais.
- Outras técnicas incluem, por exemplo, métodos de mapeamento de epitopo, tal como análises de raio x de cristais de antígeno: complexos de molécula de ligação à PCSK9 que provê resolução atômica do epitopo. Outros métodos monitoram a ligação da molécula de ligação à PCSK9 a fragmentos de antígeno ou variações mutadas do antígeno onde perda de ligação devido a uma modificação de um resíduo de aminoácido dentro da sequência de antígeno é freqüentemente considerada uma indicação de um componente de epitopo. Ainda, métodos combinatoriais computacionais para

mapeamento de epitopo podem ser também usados. Esses métodos se apoiam na habilidade da molécula de ligação à PCSK9 de interesse em isolar por afinidade peptídeos curtos específicos de bibliotecas de peptídeo de exibição em fago combinatoriais. Os peptídeos são então considerados como os mais importantes para a definição do epitopo correspondendo à molécula de ligação à PCSK9 usada para avaliar a biblioteca de peptídeo. Para mapeamento de epitopo, algoritmos computacionais foram também desenvolvidos, os quais foram mostrados mapear epitopos descontínuos conformacionais.

10 Conforme aqui usado, o termo "indivíduo" inclui qualquer animal humano ou não-humano.

O termo "animal não-humano" inclui todos os vertebrados não-humanos, por exemplo, mamíferos e não-mamíferos, tal como primatas não-humanos, roedores, coelhos, ovelha, cachorros, gatos, cavalos, vacas, aves, anfíbios, répteis, etc.

15 Uma sequência de nucleotídeo é dita ser "otimizada" se ela tiver sido alterada para codificar uma sequência de aminoácido usando códons que são preferidos na célula ou organismo produtor, geralmente uma célula eucariótica, por exemplo, uma célula de levedura tal como *Pichia*, uma célula de inseto, uma célula de mamífero tal como célula de Ovário de Hamster Chinês (CHO) ou uma célula humana. A sequência de nucleotídeo otimizada é projetada para codificar uma sequência de aminoácido idêntica ou quase idêntica à sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo de partida inicial, que é também conhecida como a sequência "de origem".

25 Conforme aqui usado, o termo "anticorpos projetados humanos" significa anticorpos que se ligam ao mesmo epitopo, mas diferem em sequência. Tecnologias de exemplo incluem anticorpos projetados humanos produzidos por tecnologia de projeção humana de Kalobios, onde a sequência da região de ligação de antígeno é derivada através de, por exemplo, mutação, ao invés de devido a substituições de aminoácido conservativas (vide, por exemplo, WO2004/072266, WO2005/069970).

30

Vários aspectos da invenção são descritos em detalhes adicionais nas subseções que seguem.

Ensaio padrão para avaliar a habilidade de moléculas em se ligarem à PCSK9 de várias espécies, em particular epitopos de PCSK9, são conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, ELISAs e *western blots*. Determinação de se uma molécula de ligação à PCSK9 se liga a um epitopo específico de PCSK9 pode empregar um ensaio de competição de epitopo de peptídeo. Por exemplo, uma molécula de ligação à PCSK9 é incubada com um peptídeo correspondente a um epitopo de PCSK9 de interesse em concentrações de saturação de peptídeo. A molécula de ligação à PCSK9 pré-incubada é testada quanto à ligação à PCSK9 imobilizada, por exemplo, através de análise Biacore[®]. Inibição da ligação à PCSK9 através da pré-incubação com o peptídeo indica que a molécula de ligação à PCSK9 se liga ao epitopo de peptídeo (vide, por exemplo, Publicação de Patente U.S. 20070072797). Cinética de ligação pode ser também avaliada através de ensaios padrão conhecidos na técnica, tal como análise Biacore[®]. Ensaio para avaliar os efeitos de moléculas de ligação à PCSK9 sobre propriedades funcionais de PCSK9 são descritos em mais detalhes abaixo.

Deste modo, uma molécula de ligação à PCSK9 que "inibe" uma ou mais dessas propriedades funcionais de PCSK9 (por exemplo, bioquímica, celular, fisiológica ou outras atividades biológicas ou similar), conforme determinado de acordo com metodologias conhecidas da técnica e descritas aqui, será compreendida produzir uma diminuição estatisticamente significativa na propriedade funcional particular com relação àquela vista na ausência da molécula de ligação (por exemplo, quando uma molécula controle de especificidade irrelevante está presente). Uma molécula de ligação à PCSK9 que inibe atividade de PCSK9 afeta tal diminuição estatisticamente significativa em pelo menos 5% do parâmetro medido. Em certas modalidades, um anticorpo ou outra molécula de ligação à PCSK9 pode produzir uma diminuição na propriedade funcional selecionada de pelo menos 10%, 20%, 30% ou 50% comparado com controle. Em algumas modalidades, inibição de PCSK9 é determinada através da medição dos níveis de LDL-R. Um au-

mento nos níveis de LDL-R na presença de uma molécula de ligação à PCSK9 indica que a molécula de ligação à PCSK9 inibe PCSK9.

Anticorpos

Os anticorpos anti-PCSK9 descritos aqui incluem anticorpos monoclonais humanos. Em algumas modalidades, as porções de ligação de antígeno de anticorpos que se ligam à PCSK9 (por exemplo, cadeias V_H e V_L) são "misturadas e combinadas" para criar outras moléculas de ligação anti-PCSK9. A ligação de tais anticorpos "misturados e combinados" pode ser testada usando os ensaios de ligação acima mencionados (por exemplo, ELISAs). Quando selecionando uma V_H para misturar e combinar com uma sequência V_L particular, tipicamente uma pessoa seleciona V_H que é estruturalmente similar à V_H que ela substitui no emparelhamento com aquela V_L . Da mesma maneira, uma sequência de cadeia pesada de comprimento integral de um emparelhamento de cadeia pesada de comprimento integral/cadeia leve de comprimento integral particular é geralmente substituída com uma sequência de cadeia pesada de comprimento completo estruturalmente similar. Da mesma maneira, uma sequência V_L de um par V_H/V_L particular deve ser substituída com uma sequência V_L estruturalmente similar. Da mesma maneira, uma sequência de cadeia leve de comprimento completo de um par de cadeia pesada de comprimento integral/cadeia leve de comprimento integral particular deve ser substituída com uma sequência de cadeia leve de comprimento integral estruturalmente similar. Identificação de similaridade estrutural neste contexto é um processo bem conhecido na técnica.

Em outros aspectos, a invenção provê anticorpos que compreendem a cadeia pesada e a cadeia leve CDR1s, CDR2s e CDR3s de um ou mais anticorpos de ligação à PCSK9, em várias combinações. Dado que cada um desses anticorpos pode se ligar à PCSK9 e que especificidade de ligação de antígeno é provida principalmente pelas regiões CDR1, 2 e 3, as sequências CDR1, 2 e 3 de V_H e as sequências CDR1, 2 e 3 de V_L podem ser "misturadas e combinadas" (isto é, CDRs de anticorpos diferentes podem ser misturadas e combinadas). Ligação à PCSK9 de tais anticorpos

"misturados e combinados" pode ser testada usando os ensaios de ligação descritos aqui (por exemplo, ELISAs). Quando as sequências CDR de V_H são misturadas e combinadas, a sequência CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma sequência de V_H particular deve ser substituída com uma sequência(s) CDR estruturalmente similar. Da mesma maneira, quando sequências CDR de V_L são misturadas e combinadas, a sequência CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma sequência V_L particular deve ser substituída com sequência(s) de CDR estruturalmente similares. Identificação de similaridade estrutural neste contexto é um processo bem conhecido na técnica.

10 Conforme aqui usado, um anticorpo humano compreende regiões variáveis de cadeia pesada ou leve ou cadeias pesadas ou leves de comprimento integral que são "o produto de" ou "derivadas de" uma sequência de linha germinativa particular se as regiões variáveis ou cadeias de comprimento integral do anticorpo forem obtidas a partir de um sistema que
15 usa genes de imunoglobulina de linha germinativa humana na fonte das sequências. Em tal sistema, um anticorpo humano é criado em um camundongo transgênico carregando genes da imunoglobulina humana. O transgênico é imunizado com o antígeno de interesse (por exemplo, um epitopo de hPCK9 descrito aqui). Alternativamente, um anticorpo humano é identifica-
20 do ao prover uma biblioteca de gene de imunoglobulina humana exposta em fago e avaliação da biblioteca com o antígeno de interesse (por exemplo, hPCK9 ou um epitopo de hPCK9 descrito aqui).

Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado de" uma sequência de imunoglobulina de linha germinativa humana pode ser
25 identificado como tal através de comparação da sequência de aminoácido do anticorpo humano com as sequências de aminoácido de imunoglobulinas de linha germinativa humana e seleção da sequência de imunoglobulina de linha germinativa humana que é mais próxima em sequência (isto é, identidade % maior) da sequência do anticorpo humano. Um anticorpo humano que
30 é "o produto de" ou "derivado de" uma sequência de imunoglobulina de linha germinativa humana particular pode conter diferenças de aminoácido comparado com a sequência codificada com a linha germinativa, devido a, por

exemplo, mutações somáticas de ocorrência natural ou mutações direcionadas ao sítio artificiais. No entanto, um anticorpo humano selecionado tipicamente tem uma sequência de aminoácido pelo menos 90% idêntica a uma sequência de aminoácido codificada por um gene da imunoglobulina da linha germinativa humana e contém resíduos de aminoácido que identificam o anticorpo humano como sendo humano quando comparado com as sequências de aminoácido de imunoglobulina de linha germinativa de outras espécies (por exemplo, sequências de linha germinativa de murino). Em certos casos, um anticorpo humano pode ser pelo menos 60%, 70%, 80%, 90% ou pelo menos 95% ou até mesmo pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% idêntico em sequência de aminoácido à sequência de aminoácido codificada pelo gene da imunoglobulina de linha germinativa.

A identidade percentual entre duas sequências é uma função do número de posições de identidade compartilhadas pelas sequências (isto é, % de identidade = No. de posições de identidade/total de No. de posições x 100), levando em consideração o número de lacunas, e o comprimento de cada lacuna, que precisa ser introduzido para alinhamento ótimo das duas sequências. A comparação de sequências e determinação de identidade percentual entre duas sequências são determinadas usando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller (1988 *Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17) que foi incorporado ao programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de resíduo de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12 e uma penalidade de lacuna de 4.

Tipicamente, uma V_H ou V_L de um anticorpo humano derivado de uma sequência de linha germinativa humana particular vai mostrar diferenças de não mais do que 10 aminoácidos da sequência de aminoácido codificada pelo gene da imunoglobulina de linha germinativa humana. Em certos casos, a V_H ou V_L do anticorpo humano pode mostrar diferença de não mais do que 5, ou até mesmo não mais do que 4, 3, 2 ou 1, aminoácidos da sequência de aminoácido codificada pelo gene da imunoglobulina da linha germinativa.

Anticorpos de camelídeo

Proteínas de anticorpo obtidas de membros das famílias camelo e dromedário (*Camelus bactrianus* e *Camelus dromaderius*), incluindo membros do Novo Mundo tal como espécies lhama (*Lama paccos*, *Lama glama* e *Lama vicugna*), foram caracterizadas com relação ao tamanho, complexidade estrutural e antigenicidade para indivíduos humanos. Certos anticorpos IgG encontrados na natureza nesta família de mamíferos não têm cadeias leves, e são então estruturalmente distintos da estrutura quaternária de quatro cadeias tendo duas cadeias pesadas e duas leves típicas para anticorpos de outros animais. Vide WO 94/04678.

10 Uma região do anticorpo de camelídeo que é o domínio variável único, pequeno, identificada como V_{HH} pode ser obtida através de projeção genética para dar uma proteína pequena tendo alta afinidade para um alvo, resultando em uma proteína derivada de anticorpo, de peso molecular baixo, conhecida como "nanocorpo de camelídeo". Vide Patente U.S. No. 15 5.759.808; vide também Stijlemans e outros, 2004 *J. Biol. Chem.* 279: 1256-1261; Dumoulin e outros, 2003 *Nature* 424:783-788; Pleschberger e outros, 2003 *Bioconjugate Chem.* 14: 440-448; Cortez-Retamozo e outros, 2002 *Int. J. Cancer* 89: 456-62; e Lauwereys e outros, 1998 *EMBO J.* 17: 3512-3520. Bibliotecas projetadas de anticorpos e fragmentos de anticorpo de camelídeo 20 estão comercialmente disponíveis, por exemplo, da Ablynx, Ghent, Bélgica. Como com outros anticorpos de origem não-humana, uma sequência de aminoácido de um anticorpo de camelídeo pode ser alterada recombinantemente para obter uma sequência que lembra mais proximamente uma sequência humana, isto é, o nanocorpo pode ser "humanizado". Então a antigenicidade baixa natural de anticorpos de camelídeo para humanos pode ser 25 reduzida mais.

O nanocorpo de camelídeo tem um peso molecular aproximadamente um décimo daquele de uma molécula IgG humana, e a proteína tem um diâmetro físico de apenas alguns nanômetros. Uma consequência 30 do tamanho pequeno é a habilidade de nanocorpos de camelídeo em se ligarem a sítios antigênicos que são funcionalmente invisíveis para proteínas de anticorpo maiores, isto é, nanocorpos de camelídeo são úteis como rea-

gentes para detectar antígenos que são de outro modo crípticos usando técnicas imunológicas clássicas, e como possíveis agentes terapêuticos. Então, ainda outra consequência de tamanho pequeno é que um nanocorpo de camelídeo pode inibir como um resultado de ligação a um sítio específico em uma ranhura ou fissura estreita de uma proteína alvo, e então pode servir em uma capacidade que lembra mais proximamente a função de um fármaco de peso molecular baixo clássico do que aquela de um anticorpo clássico.

5 O peso molecular baixo e o tamanho compacto resultam ainda em nanocorpos de camelídeo sendo extremamente termoestáveis, estáveis a pH extremo e à digestão proteolítica e pobremente antigênicos. Outra consequência é que nanocorpos de camelídeo se movem prontamente do sistema circulatório para tecidos e mesmo através da barreira sangue-cérebro e podem tratar distúrbios que afetam o tecido nervoso. Nanocorpos podem ainda facilitar transporte de fármaco através da barreira sangue cérebro. Vi-

10 de Publicação de Patente U.S. No. 20040161738 publicada em 19 de agosto de 2004. Essas características combinadas com a antigenicidade baixa em humanos indica maior potencial terapêutico. Ainda, essas moléculas podem ser integralmente expressas em células procarióticas tal como *E. coli*.

Deste modo, uma característica da presente invenção é um anti-

20 corpo de camelídeo ou nanocorpo de camelídeo tendo alta afinidade para PCSK9. Em certas modalidades aqui, o anticorpo ou nanocorpo de camelídeo é naturalmente produzido no animal camelídeo, isto é, é produzido pelo camelídeo seguindo imunização com PCSK9 ou um fragmento de peptídeo da mesma, usando técnicas descritas aqui para outros anticorpos. Alternati-

25 vamente, o nanocorpo de camelídeo anti-PCSK9 é projetado, isto é, produzido através de seleção, por exemplo, a partir de uma biblioteca de fago mostrando proteínas de nanocorpo de camelídeo apropriadamente mutagenizadas usando procedimentos de "panning" com PCSK9 ou epitopo de PCSK9 descrito aqui como um alvo. Nanocorpos projetados podem ainda

30 ser customizados através de projeção genética para aumentar a meia-vida em um indivíduo recipiente de 45 minutos a duas semanas.

Diacorpos

Diacorpos são moléculas biespecíficas, bivalentes, onde domínios V_H e V_L são expressos em uma cadeia de polipeptídeo única, conectados por um ligante que é muito curto para permitir emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Os domínios V_H e V_L emparelham com domínios complementares de outra cadeia, deste modo criando dois sítios de ligação de antígeno (vide, por exemplo, Holliger e outros, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak e outros 1994, *Structure* 2:1121-1123). Diacorpos podem ser produzidos expressando duas cadeias de polipeptídeo ou com a estrutura $V_{HA}-V_{LB}$ e $V_{HB}-V_{LA}$ (configuração V_H-V_L) ou $V_{LA}-V_{LB}$ (configuração V_L-V_H) dentro da mesma célula. A maioria deles pode ser expressa em forma solúvel em bactérias.

Diacorpos de cadeia simples (scDb) são produzidos através de conexão de duas cadeias de polipeptídeo de formação de diacorpo com ligante de aproximadamente 15 resíduos de aminoácido (vide Hollifer e Winter, 1997 *Cancer Immunol. Immunother.*, 45(3-4): 128-30; Wu e outros, 1996 *Immunotechnology*, 2(1): 21-36). scDb pode ser expresso em bactérias em forma monomérica ativa, solúvel, (vide Holliger e Winter, 1997 *Cancer Immunol. Immunother.*, 45 (34): 128-30; Wu e outros, 1996 *Immunotechnology*, 2(1): 21-36; Pluckthun e Pack, 1997 *Immunotechnology*, 3(2): 83-105; Ridgeway e outros, 1996 *Protein Eng.*, 9(7): 617-21).

Um diacorpo pode ser fundido a Fc para gerar um "di-diacorpo" (vide Lu e outros, 2004 *J. Biol. Chem.*, 279(4): 2856-65).

Anticorpos projetados e modificados

Um anticorpo da invenção pode ser preparado usando um anticorpo tendo uma ou mais seqüências V_H e/ou V_L como material de partida para projetar um anticorpo modificado, anticorpo modificado que pode ter propriedades alteradas do anticorpo de partida. Um anticorpo pode ser projetado através da modificação de um ou mais resíduos dentro de uma ou ambas as regiões variáveis (isto é, V_H e/ou V_L), por exemplo, dentro de uma ou mais regiões CDR e/ou dentro de uma ou mais regiões de estrutura principal. Adicionalmente ou alternativamente, um anticorpo pode ser projetado através da modificação de resíduos dentro da(s) região(ões) constante(s).

por exemplo, para alterar a(s) função(ões) efetora(s) do anticorpo.

Um tipo de projeção de região variável que pode ser realizado é enxerto de CDR. Anticorpos interagem com antígenos alvo predominantemente através de resíduos de aminoácido que estão localizados nas seis CDRs de cadeias pesada e leve. Por esta razão, as sequências de aminoácido dentro das CDRs são mais diversas entre anticorpos individuais do que sequências fora das CDRs. Devido ao fato das sequências de CDR serem responsáveis pela maioria das interações anticorpo-antígeno, é possível expressar anticorpos recombinantes que imitam as propriedades de anticorpos de ocorrência natural específicos através da construção de vetores de expressão que incluem sequências de CDR do anticorpo de ocorrência natural específico enxertadas em sequências de estrutura principal de um anticorpo diferente com propriedades diferentes (vide, por exemplo, Riechmann e outros, 1998 *Nature* 332: 323-327; Jones e outros, 1986 *Nature* 321: 522-525; Queen e outros, 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10029-10033; Patente U.S. No. 5.225.539 e Patentes U.S. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370).

Sequências de estrutura principal podem ser obtidas de bancos de dados de DNA públicos ou referências publicadas que incluem sequências de gene de anticorpo de linha germinativa. Por exemplo, sequências de DNA de linha germinativa para genes de região variável de cadeias pesada e leve humanas podem ser encontradas no banco de dados de sequência de linha germinativa humana "VBase" (disponível na Internet no www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), bem como em Kabat e outros, 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson e outros, 1992, *J. Mol. Biol.* 227:776-798; e Cox e outros, 1994 *Eur. J. Immunol.* 24: 827-836; os conteúdos de cada um são aqui expressamente incorporados a título de referência.

As sequências CDR1, 2 e 3 de V_H e as sequências CDR1, 2 e 3 de V_L podem ser enxertadas em regiões de estrutura principal que têm a sequência idêntica àquela encontrada no gene de imunoglobulina de linha

germinativa da qual a sequência de estrutura principal é derivada, ou as sequências de CDR podem ser enxertadas em regiões de estrutura principal que contêm uma ou mais mutações comparado com as sequências de linha germinativa. Por exemplo, foi constatado que em certos casos é benéfico mutar resíduos dentro das regiões de estrutura principal para manter ou aumentar a habilidade de ligação de antígeno do anticorpo (vide, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370).

CDRs podem ser também enxertadas em regiões de estrutura principal de polipeptídeos outras que não domínios de imunoglobulina. *Molécula matriz ("scaffolds")* apropriados formam uma estrutura principal conformacionalmente estável que mostra os resíduos enxertados de modo que eles formam uma superfície localizada e ligam o alvo de interesse (por exemplo, PCSK9). Por exemplo, CDRs podem ser enxertadas em um *scaffold* onde as regiões de estrutura principal são baseadas em fibronectina, anquirina, lipocalina, neocarzinostatina, citocroma b, dedo de zinco CP1, PST1, "coiled coil", LACI-D1, domínio Z ou tendramisate (vide, por exemplo, Nygren e Uhlen, 1997 *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 463-469).

Outro tipo de modificação de região variável é mutação de resíduos de aminoácido dentro das regiões CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de V_H e/ou V_L para então melhorar uma ou mais propriedades de ligação (por exemplo, afinidade) do anticorpo de interesse, conhecida como "maturação de afinidade". Mutagênese direcionada a sítio ou mutagênese mediada por PCR pode ser realizada para introduzir a(s) mutação(ões), e o efeito sobre ligação de anticorpo, ou outra propriedade funcional de interesse, pode ser avaliado em ensaios *in vitro* ou *in vivo* conforme aqui descrito. Modificações conservativas podem ser introduzidas. As mutações podem ser substituições, adições ou deleções de aminoácido. Além disso, tipicamente não mais do que um, dois, três, quatro ou cinco resíduos dentro de uma região de CDR são alterados.

Os anticorpos projetados da invenção incluem aqueles onde modificações foram feitas em resíduos da estrutura principal dentro de V_H e/ou V_L , por exemplo, para melhorar as propriedades do anticorpo. Tipica-

mente tais modificações da estrutura principal são feitas para diminuir a imunogenicidade do anticorpo. Por exemplo, uma abordagem é "retromutar" um ou mais resíduos de estrutura principal para a sequência de linha germinativa correspondente. Mais especificamente, um anticorpo que sofreu mutação somática pode conter resíduos de estrutura principal que diferem da sequência de linha germinativa da qual o anticorpo é derivado. Tais resíduos podem ser identificados através da comparação das sequências de estrutura principal do anticorpo com as sequências de linha germinativa da qual o anticorpo é derivado. Para retornar as sequências de região de estrutura principal para sua configuração de linha germinativa, as mutações somáticas podem ser "retromutadas" para a sequência da linha germinativa através de, por exemplo, mutagênese direcionada ao sítio ou mutagênese mediada por PCR. Tais anticorpos "retromutados" pretendem também ser compreendidos pela invenção.

Outro tipo de modificação de estrutura principal envolve mutação de um ou mais resíduos dentro da região de estrutura principal, ou até mesmo dentro de uma ou mais regiões de CDR, para remover epitopos de célula T para então reduzir imunogenicidade potencial do anticorpo. Esta abordagem é também referida como "desimunização" e é descrita em mais detalhes na Publicação de Patente U.S. No. 20030153043 de Carr e outros.

Em adição ou alternativa às modificações feitas dentro das regiões de estrutura principal ou CDR, anticorpos da invenção podem ser projetados para incluir modificações dentro da região Fc, tipicamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tal como meia-vida no soro, fixação de complemento, ligação de receptor Fc e/ou citotoxicidade celular dependente de antígeno. Ainda, um anticorpo da invenção pode ser quimicamente modificado (por exemplo, uma ou mais porções químicas podem ser ligadas ao anticorpo) ou ser modificado para alterar sua glicosilação, novamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo.

Em uma modalidade, a região de união de CH1 é modificada de modo que o número de resíduos cisteína na região de união é alterado, por exemplo, aumentado ou diminuído. Esta abordagem é descrita ainda na Pa-

tente U.S. No. 5.677.425 de Bodmer e outros. O número de resíduos cisteína na região de união de CH1 é alterado para, por exemplo, facilitar montagem das cadeias leve e pesada ou para aumentar ou diminuir a estabilidade do anticorpo.

5 Em outra modalidade, a região de união de Fc de um anticorpo é mutada para diminuir a meia-vida biológica do anticorpo. Mais especificamente, uma ou mais mutações de aminoácido são introduzidas na região de interface de domínio CH2-CH3 do fragmento de união de Fc de modo que o anticorpo tem ligação de proteína A *Staphylococcyi* (SpA) prejudicada com
10 relação à ligação de SpA do domínio de união de Fc nativo. Esta abordagem é descrita em mais detalhes na Patente U.S. No. 6.165.745 de Ward e outros.

 Em outra modalidade, o anticorpo é modificado para aumentar sua meia-vida biológica. Várias abordagens são possíveis. Por exemplo, a
15 Patente U.S. No. 6.277.375 descreve as mutações que seguem em um IgG que aumenta sua meia-vida *in vivo*: T252L, T254S, T256F. Alternativamente, para aumentar a meia-vida biológica, o anticorpo pode ser alterado dentro da região CH1 ou CL para conter um epítipo de ligação de receptor selvagem obtido de duas alças de um domínio CH2 de uma região Fc de um IgG, conforme descrito nas Patentes U.S. Nos. 5.869.046 e 6.121.022 de Presta e
20 outros.

 Em ainda outras modalidades, a região Fc é alterada substituindo pelo menos um resíduo de aminoácido com um resíduo de aminoácido diferente para alterar as funções efetoras do anticorpo. Por exemplo, um ou
25 mais aminoácidos podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido diferente de modo que o anticorpo tem uma afinidade alterada para um ligante efector, mas retém a habilidade de ligação de antígeno do anticorpo de origem. O ligante efector para o qual afinidade é alterada pode ser, por exemplo, um receptor Fc ou o componente C1 de complemento. Esta abordagem
30 é descrita em mais detalhes nas Patentes U.S. Nos. 5.624.821 e 5.648.260, ambas para Winter e outros.

 Em outra modalidade, um ou mais aminoácidos selecionados de

resíduos de aminoácido podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido diferente de modo que o anticorpo tem ligação com C1q alterada e/ou citotoxicidade complemento-dependente (CDC) reduzida ou abolida. Esta abordagem é descrita em mais detalhes na Patente U.S. No. 6.194.551 de Idusogie e outros.

Em outra modalidade, um ou mais resíduos de aminoácido são alterados para então alterar a habilidade do anticorpo em fixar complemento. Esta abordagem é descrita mais no WO 94/29351 de Bodmer e outros.

Em ainda outra modalidade, a região Fc é modificada para aumentar a habilidade do anticorpo em mediar citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou para aumentar a afinidade do anticorpo para um receptor Fcγ através da modificação de um ou mais aminoácidos. Esta abordagem é descrita mais no WO 00/42072 de Presta. Além disso, os sítios de ligação em IgG1 humano para FcγRI, FcγRII, FcγRIII e FcRn foram mapeados e variantes com ligação aperfeiçoada foram descritas (vide Shields, R.L. e outros, 2001 *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604).

Em ainda outra modalidade, a glicosilação de um anticorpo é modificada. Por exemplo, um anticorpo aglicosilado pode ser feito (isto é, o anticorpo não tem glicosilação). Glicosilação pode ser alterada, por exemplo, para aumentar a afinidade do anticorpo para um antígeno. Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas através de, por exemplo, alteração de um ou mais sítios de glicosilação dentro da sequência de anticorpo. Por exemplo, uma ou mais substituições de aminoácido podem ser feitas que resultam em eliminação de um ou mais sítios de glicosilação de estrutural principal de região variável para então eliminar glicosilação neste sítio. Tal aglicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo para antígeno. Tal abordagem é descrita em mais detalhes nas Patentes U.S. Nos. 5.714.350 e 6.350.861 de Co e outros.

Adicionalmente ou alternativamente, um anticorpo pode ser feito, o qual tem tipo de glicosilação alterado, tal como um anticorpo hipofucosilado tendo quantidades reduzidas de resíduos fucosila ou um anticorpo tendo estruturas GlcNac divididas aumentadas. Tais padrões de glicosilação alte-

rados foram demonstrados aumentar a habilidade de ADCC de anticorpos. Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas através de, por exemplo, expressão do anticorpo na célula hospedeiro com mecânica de glicosilação alterada. Células com mecânica de glicosilação alterada foram descritas na técnica e podem ser usadas como células hospedeiro onde expressar anticorpos recombinantes da invenção para então produzir um anticorpo com glicosilação alterada. Por exemplo, a EP 1.176.195 de Hang e outros descreve uma cepa de célula com um gene FUT8 funcionalmente rompido, que codifica uma fucosil transferase, de modo que os anticorpos expressos em tal cepa celular exibem hipofucosilação. A Publicação PCT WO 03/035836 de Presta descreve uma cepa de célula CHO variante, células Lecl3, com habilidade reduzida em ligar fucose a carboidratos ligados a Asn(297), também resultando em hipofucosilação de anticorpos expressos nesta célula hospedeiro (vide também Shields, R.L. e outros, 2002, *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740). O WO 99/54342 de Umana e outros descreve cepas de célula projetadas para expressar glicosil transferases de modificação de glicoproteína (por exemplo, beta(1,4)-N acetilglicosaminiltransferase III (GnTIII)) de modo que os anticorpos expressos nas cepas de célula projetadas exibem estruturas GlcNac divisoras que resultam em atividade ADCC aumentada dos anticorpos (vide também Umana e outros, 1999 *Nat. Biotech.* 17:176-180).

Outra modificação dos anticorpos aqui que é compreendida pela invenção é peguilação. Um anticorpo pode ser peguilado para, por exemplo, aumentar a meia-vida biológica (por exemplo, soro) do anticorpo. Para peguilar um anticorpo, o anticorpo, ou fragmento do mesmo, tipicamente é reagido com polietileno glicol (PEG), tal como um éster reativo ou derivado de aldeído de PEG, sob condições onde uma ou mais porções de PEG ficam ligadas ao anticorpo ou fragmento de anticorpo. A peguilação pode ser realizada através de uma reação de acilação ou uma reação de alquilação com uma molécula de PEG reativa (ou um polímero solúvel em água reativo análogo). Conforme aqui usado, o termo "polietileno glicol" pretende compreender qualquer uma das formas de PEG que foram usadas para derivatizar

outras proteínas, tal como mono (C1-C10) alcóxi- ou arilóxi-poliétileno glicol ou poliétileno glicol maleimida. Em certas modalidades, o anticorpo a ser peguilado é um anticorpo aglicosilado. Métodos para peguilação de proteínas são conhecidos no campo e podem ser aplicados aos anticorpos da invenção. Vide, por exemplo, EP 0 154 316 de Nishimura e outros e EP 0 401 384 de Ishikawa e outros.

Ainda, peguilação pode ser conseguida em qualquer parte de um polipeptídeo de ligação à PCSK9 da invenção através da introdução de um aminoácido não-natural. Certos aminoácidos não-naturais podem ser introduzidos através da tecnologia descrita em Deiters e outros, *J. Am. Chem. Soc.* 125:11782-11783, 2003; Wang e Schultz, *Science* 301:964-967, 2003; Wang e outros, *Science* 292:498-500, 2001; Zhang e outros, *Science* 303: 371-373, 2004 ou na Patente U.S. No. 7.083.970. Em suma, alguns dos sistemas de expressão envolvem mutagênese direcionada a sítio para introduzir um códon de não-sentido, tal como um TAG âmbar, na estrutura de leitura aberta codificando um polipeptídeo da invenção. Tais vetores de expressão são então introduzidos em um hospedeiro que pode utilizar um tRNA específico para o códon de não-sentido introduzido e carregado com o aminoácido não-natural de escolha. Aminoácidos não-naturais particulares que são benéficos para propósito de conjugação de porções ao polipeptídeo da invenção incluem aqueles com cadeias laterais acetileno e azido. Os polipeptídeos contendo esses aminoácidos novos podem então ser peguilados nesses sítios escolhidos na proteína.

Métodos de projeção de anticorpos

Conforme acima discutido, anticorpos anti-PCSK9 podem ser usados para criar novos anticorpos de PCSK9 através da modificação de sequências de cadeia pesada e/ou cadeia leve de comprimento integral, sequências V_H e/ou V_L , ou a(s) região(ões) constante(s) ligada(s) a elas. Por exemplo, uma ou mais regiões CDR dos anticorpos podem ser combinadas recombinantemente com regiões de estrutura principal conhecidas e/ou outras CDRs para criar anticorpos anti-PCSK9, recombinantemente projetados, novos. Outros tipos de modificações incluem aquelas descritas na seção anterior. O

material de partida para o método de projeção é uma ou mais das sequências V_H e/ou V_L , ou uma ou mais regiões CDR das mesmas. Para criar o anticorpo projetado, não é necessário realmente preparar (isto é, expressão como uma proteína) um anticorpo tendo uma ou mais das sequências V_H e/ou V_L , ou uma ou mais regiões de CDR das mesmas. Ao invés, a informação contida na(s) sequência(s) é usada como o material de partida para criar uma sequência(s) de segunda geração derivada da(s) sequência(s) original(is) e então a(s) sequência(s) de segunda geração é(são) preparada(s) e expressa(s) como uma proteína.

10 Técnicas de biologia molecular padrão podem ser usadas para preparar e expressar a sequência de anticorpo alterada. O anticorpo codificado pela(s) sequência(s) de anticorpo alterada(s) é um que retém uma, algumas ou todas das propriedades funcionais do anticorpo anti-PCSK9 do qual ele é derivado, propriedades funcionais que incluem, mas não estão limitadas a, especificamente ligação à PCSK9, inibição de clivagem autocatalítica, inibição de ligação à LDL-R, inibição da degradação de LDL-R. As propriedades funcionais dos anticorpos alterados pode ser avaliada usando ensaios padrão disponíveis na técnica e/ou descritos aqui (por exemplo, ELISAs).

20 Em certas modalidades dos métodos de projeção de anticorpos da invenção, mutações podem ser introduzidas aleatoriamente ou seletivamente ao longo de toda ou parte de uma sequência de codificação de anticorpo anti-PCSK9 e os anticorpos anti-PCSK9 modificados resultantes podem ser avaliados quanto à atividade de ligação e/ou outras propriedades funcionais (por exemplo, inibição de clivagem autocatalítica, inibição de ligação à LDL-R, inibição de degradação de LDL-R) conforme aqui descrito. Métodos mutacionais foram descritos na técnica. Por exemplo, a Publicação PCT 02/092780 de Short descreve métodos para criação e avaliação de mutações de anticorpo usando mutagênese por saturação, montagem de ligação sintética ou uma combinação das mesmas. Alternativamente, o WO 30 03/074679 de Lazar e outros descreve métodos de uso de métodos de avaliação computacional para otimizar propriedades físico-químicas de anticorpos.

Moléculas de ligação à PCSK9 não-anticorpo

A invenção provê ainda moléculas de ligação à PCSK9 que exibem propriedades funcionais de anticorpos, mas derivam sua estrutura principal e porções de ligação de antígeno de outros polipeptídios (por exemplo, outros polipeptídeos que não aqueles codificados por genes de anticorpo ou gerados pela recombinação de genes de anticorpo *in vivo*). Os domínios de ligação de antígeno (por exemplo, domínios de ligação à PCSK9) dessas moléculas de ligação são gerados através de um processo de evolução direto. Vide Patente U.S. No. 7.115.396. Moléculas que têm uma dobra geral similar àquela de um domínio variável de um anticorpo (uma dobra "tipo imunoglobulina") são proteínas *scaffold* apropriadas. Proteínas *scaffold* adequadas para derivação de moléculas de ligação de antígeno incluem fibronectina ou um dímero de fibronectina, tenascina, N-caderina, E-caderina, ICAM, titina, receptor de GCSF, receptor de citocina, inibidor de glicosidase, cromoproteína antibiótica, molécula de adesão em membrana de mielina P0, CD8, CD4, CD2, MHC classe I, receptor de antígeno de célula T, domínios SET CD1, CD2 e I de VCAM-1, domínio de imunoglobulina SET I de proteína C de ligação à miosina, domínio de imunoglobulina SET I ou proteína H de ligação à miosina, domínio de imunoglobulina SET I de "telokin", NCAM, *twichitin*, neurógliã, receptor de hormônio do crescimento, receptor de eritropoietina, receptor de prolactina, receptor de interferon-gama, β -galactosidase/ glucuronidase, β -glucuronidase, transglutaminase, receptor de antígeno de célula T, superóxido dismutase, domínio de fator de tecido, citocroma F, proteína verde fluorescente, GroEL e taumatina.

O domínio de ligação de antígeno (por exemplo, a dobra tipo imunoglobulina) da molécula de ligação a não-anticorpo pode ter uma massa molecular de menos do que 10 kD ou maior do que 7,5 kD (por exemplo, uma massa molecular entre 7,5-10 kD). A proteína usada para derivar o domínio de ligação de antígeno é uma proteína de mamífero de ocorrência natural (por exemplo, uma proteína humana), e o domínio de ligação de antígeno inclui até 50% (por exemplo, até 34%, 25%, 20% ou 15%) de aminoácidos mutados comparado com a dobra do tipo imunoglobulina da proteína da qual

ela é derivada. O domínio tendo a dobra do tipo imunoglobulina consiste em 50-150 aminoácidos (por exemplo, 40-60 aminoácidos).

Para gerar moléculas de ligação não-anticorpo, uma biblioteca de clones é criada onde sequências em regiões da proteína *scaffold* que formam superfícies de ligação de antígeno (por exemplo, regiões análogas em posição e estrutura a CDRs de uma dobra de imunoglobulina de domínio variável de anticorpo) são aleatorizadas. Clones de bibliotecas são testados quanto à ligação específica ao antígeno de interesse (por exemplo, hPCSK9) e para outras funções (por exemplo, inibição de atividade biológica de PCSK9). Clones selecionados podem ser usados como a base para aleatorização adicional e seleção para produzir derivados de afinidade maior para o antígeno.

Moléculas de ligação de alta afinidade são geradas, por exemplo, usando o décimo módulo de fibronectina III (¹⁰F_n3) como a *scaffold*. Uma biblioteca é construída para da uma das três alças tipo CDR de ¹⁰F_n3 nos resíduos 23-29, 52-55 e 78-87. Para construir cada biblioteca, segmentos de DNA codificando sequência sobrepondo cada região tipo CDR são aleatorizadas através de síntese de oligonucleotídeo. Técnicas para produção de bibliotecas de ¹⁰F_n3 selecionáveis são descritas nas Patentes U.S. Nos. 6.818.418 e 7.115.396; Roberts e Szostak, 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297; Patente U.S. No. 6.261.804; Patente U.S. No. 6.258.558; e Szostak e outros WO 98/31700.

Moléculas de ligação não-anticorpo podem ser produzidas como dímeros ou multímeros para aumentar avidéz para o antígeno alvo. Por exemplo, o domínio de ligação de antígeno é expresso como uma fusão com uma região constante (Fc) de um anticorpo que forma dímeros Fc-Fc. Vide, por exemplo, Patente U.S. No. 7.115.396.

Moléculas de ácido nucleico codificando anticorpos da invenção

Outro aspecto da invenção refere-se a moléculas de ácido nucleico que codificam as moléculas de ligação à PCSK9 da invenção. Os ácidos nucleicos podem estar presentes em células inteiras, em um lisato de célula ou podem ser ácidos nucleicos em uma forma parcialmente purificada ou

substancialmente pura. Um ácido nucleico é "isolado" ou "tornado substancialmente puro" quando purificado de outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucleicos celulares ou proteínas, através de técnicas padrão, incluindo tratamento alcalino/SDS, Associação
5 de CsCl, cromatografia de coluna, eletroforese em gel de agarose e outros bem conhecidos na técnica. Vide, F. Ausubel e outros, ed. 1987 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nova York. Um ácido nucleico da invenção pode ser, por exemplo, DNA ou RNA e pode ou não conter sequências intrônicas. Em uma modalidade, o ácido nu-
10 cleico é uma molécula de cDNA. O ácido nucleico pode estar presente em um vetor tal como um vetor de exposição em fago ou em um vetor de plasmídeo recombinante.

Os ácidos nucleicos da invenção podem ser obtidos usando técnicas de biologia molecular padrão. Para anticorpos expressos por hibridomas (por exemplo, hibridomas preparados a partir de camundongos trans-
15 gênicos carregando genes de imunoglobulina humana conforme descrito mais abaixo), cDNAs codificando as cadeias leve e pesada do anticorpo feito pelo hibridoma podem ser obtidos através de técnicas de amplificação de PCR padrão ou clonagem de cDNA. Para anticorpos obtidos a partir de uma
20 biblioteca de gene de imunoglobulina (por exemplo, usando técnica de exposição em fago), ácido nucleico codificando o anticorpo pode ser recuperado de vários clones de fago que são membros da biblioteca.

Uma vez fragmentos de DNA codificando segmentos de V_H e V_L sendo obtidos, esses fragmentos de DNA pode ser manipulados mais atra-
25 vés de técnicas de DNA recombinante padrão, por exemplo, para converter os genes da região variável em genes de cadeia de anticorpo de comprimento integral, em genes de fragmento Fab ou em gene scFv. Nessas manipulações, um fragmento de DNA codificando V_L ou V_H é operativamente ligado a
30 outra molécula de DNA, ou a um fragmento codificando outra proteína, tal como uma região constante de anticorpo ou um ligante flexível. O termo "operativamente ligado", conforme usado neste contexto, pretende significar que os dois fragmentos de DNA são unidos de uma maneira funcional, por

exemplo, de modo que as sequências de aminoácido codificadas pelos dois fragmentos de DNA permanecem em estrutura ou de modo que a proteína é expressa sob controle de um promotor desejado.

O DNA isolado codificando a região V_H pode ser convertido em um gene de cadeia pesada de comprimento integral ligando operativamente o DNA codificando V_H em outra molécula de DNA codificando regiões constantes de cadeia pesada (CH1, CH2 e CH3). As sequências de genes de região constante de cadeia pesada humana são conhecidas na técnica (vide, por exemplo, Kabat e outros, 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) e fragmentos de DNA compreendendo essas regiões podem ser obtidos através de amplificação por PCR padrão. A região constante de cadeia pesada pode ser uma região constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou IgD. Para um gene de cadeia pesada de fragmento Fab, o DNA codificando V_H pode ser operativamente ligado a outra molécula de DNA codificando apenas a região constante CH1 de cadeia pesada.

O DNA isolado codificando a região V_L pode ser convertido em um gene de cadeia leve de comprimento integral (bem como em um gene de cadeia leve de Fab) ligando operativamente o DNA codificando V_L em outra molécula de DNA codificando a região constante de cadeia leve, CL. As sequências de genes de região constante de cadeia leve humana são conhecidas na técnica (vide, por exemplo, Kabat e outros, 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) e fragmentos de DNA compreendendo essas regiões podem ser obtidos através de amplificação por PCR padrão. A região constante de cadeia leve pode ser uma região constante kappa ou lambda.

Para criar um gene scFv, os fragmentos de DNA codificando V_H e V_L são operativamente ligados a outro fragmento codificando um ligante flexível, por exemplo, codificando a sequência de aminoácido (Gly4-Ser)3, de modo que as sequências de V_H e V_L podem ser expressas como uma pro-

teína de cadeia simples contígua, com as regiões V_L e V_H unidas pelo ligante flexível (vide, por exemplo, Bird e outros, 1988 *Science* 242:423-426; Huston e outros, 1988 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty e outros, 1990 *Nature* 348:552-554).

5 Geração de Anticorpo Monoclonal

Anticorpos monoclonais (mAbs) podem ser produzidos através de uma variedade de técnicas, incluindo metodologia de anticorpo monoclonal convencional, por exemplo, a técnica de hibridização de célula somática padrão de Kohler e Milstein (1975 *Nature*, 256:495) ou usando métodos de
10 exposição de biblioteca, tal como exposição em fago.

Um sistema animal para preparação de hibridomas é o sistema de murino. Produção de hibridoma no camundongo é um procedimento bem estabelecido. Protocolos de imunização e técnicas para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos na técnica. Parceiros de
15 fusão (por exemplo, células de mieloma de murino) e procedimentos de fusão são também conhecidos.

Anticorpos quiméricos ou humanizados da presente invenção podem ser preparados com base na sequência de um anticorpo monoclonal de murino preparado conforme acima descrito. DNA codificando as imunoglobulinas de cadeias pesada e leve pode ser obtido do hibridoma de murino de interesse e projetado para conter sequências de imunoglobulina de não-murino (por exemplo, humanas) usando técnicas de biologia molecular padrão. Por exemplo, para criar um anticorpo quimérico, as regiões variáveis de murino podem ser ligadas a regiões constantes humanas usando métodos conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 4.816.567 para Cabilly e outros). Para criar um anticorpo humanizado, as regiões CDR de murino podem ser inseridas em uma estrutura principal humana usando métodos conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Patente U.S. No. 5.225.539 e Patentes U.S. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e
20 25 30 6.180.370.

Em uma certa modalidade, os anticorpos da invenção são anticorpos monoclonais humanos. Tais anticorpos monoclonais humanos dire-

cionados contra PCSK9 podem ser gerados usando camundongos transgênicos ou transcromossômicos carregando partes do sistema imune humano ao invés do sistema de camundongo. Esses camundongos transgênicos e transcromossômicos incluem camundongos referidos aqui como camundongos HuMAb e camundongos KM, respectivamente, e são coletivamente referidos aqui como "camundongo Ig humano".

O camundongo HuMAb[®] (Medarex, Inc.) contém *miniloci* de gene de imunoglobulina humana que codificam sequências de imunoglobulina de cadeias pesada (μ e γ) e leve K humanas rearranjadas, junto com mutações alvo que inativam os *loci* de cadeias μ e K endógenas (vide, por exemplo, Lonberg e outros, 1994 *Nature* 368(6474): 856-859). Deste modo, os camundongos exibem expressão reduzida de IgM de camundongo ou K, e em resposta à imunização, os transgenes de cadeias pesada e leve humanos introduzidos sofrem mudança de classe e mutação somática para gerar monoclonal gGK humano de alta afinidade (Lonberg, N. e outros, 1994 *supra*; revisto em Lonberg, N., 1994 *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. e Huszar, D., 1995 *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 e Harding, F. e Lonberg, N., 1995, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546). A preparação e o uso de camundongos HuMAb, e as modificações genômicas carregadas por tais camundongos, são descritos mais em Taylor, L. e outros, 1992 *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. e outros, 1993 *International Immunology* 5:647-656; Tuailleon e outros, 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3720-3724; Choi e outros, 1993 *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. e outros, 1993 *EMBO J.* 12:821-830; Tuailleon e outros, 1994 *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. e outros, 1994 *International Immunology* 579-591; e Fishwild, D. e outros, 1996 *Nature Biotechnology* 14:845-851, os conteúdos de todos são aqui especificamente incorporados a título de referência em sua totalidade. Vide ainda Patentes U.S. Nos. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299 e 5.770.429; todas para Lonberg e Kay; Patente U.S. No. 5.545.807 para Surani e outros; Publicações PCT Nos. WO 92/103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/113852, WO 98/24884 e WO 99/45962, to-

das para Lonberg e Kay; e Publicação PCT No. WO 01/14424 para Korman e outros.

5 Em outra modalidade, anticorpos humanos da invenção podem ser criados usando um camundongo que carrega sequências de imunoglobulina humana em transgenes e transcromossomos, tal como um camundongo que carrega um transgene de cadeia pesada humana e um transcromossomo de cadeia leve humana. Tais camundongos, referidos aqui como "camundongos KM", são descritos em detalhes no WO 02/43478.

10 Ainda, sistemas animais transgênicos alternativos expressando genes de imunoglobulina humana estão disponíveis na técnica e podem ser usados para criar anticorpos anti-PCSK9 da invenção. Por exemplo, um sistema transgênico alternativo referido como Xenomouse[®] (Abgenix, Inc.) pode ser usado. Tais camundongos são descritos nas, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.548 e 6.162.963 para Kuchelapati e outros.

15 Além disso, sistemas animais transcromossômicos alternativos expressando genes da imunoglobulina humana estão disponíveis na técnica e podem ser usados para criar anticorpos anti-PCSK9 da invenção. Por exemplo, camundongos carregando ambos o transcromossomo de cadeia pesada humana e um transcromossomo de cadeia leve humana, referidos como "camundongos TC" podem ser usados; tais camundongos são descritos em Tomizuka e outros, 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Ainda, vacas carregando transcromossomos de cadeias pesada e leve humanas foram descritas na técnica (Kuroiwa e outros, 2002 *Nature Biotechnology* 20:889-894) e podem ser usadas para criar anticorpos anti-PCSK9 da invenção.

25 Os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser também preparados usando métodos de exibição em fago para avaliação de bibliotecas de genes da imunoglobulina humana. Tais métodos de exibição em fago para isolamento de anticorpos humanos são estabelecidos na técnica. Vide, por exemplo: Patentes U.S. Nos. 5.223.409; 5.403.484; e 5.571.698 para Ladner e outros; Patentes U.S. Nos. 5.427.908 e 5.580.717

para Dower e outros; Patentes U.S. Nos. 5.969.108 e 6.172.197 para McCafferty e outros; e Patentes U.S. Nos. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 e 6.593.081 para Griffiths e outros. Bibliotecas podem ser avaliadas quanto à ligação à PCSK9 de comprimento integral ou a um epitopo particular de PCSK9.

Os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser também preparados usando camundongos SCID onde células imunes humanas foram reconstituídas de modo que uma resposta de anticorpo humano pode ser gerada quando da imunização. Tais camundongos são descritos nas, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.476.996 e 5.698.767 para Wilson e outros.

Geração de anticorpos monoclonais humanos em Camundongo Ig Humanos

PCSK9 humana recombinante purificada expressa em células procarióticas (por exemplo, *E. coli*) ou células eucarióticas (por exemplo, células de mamífero, por exemplo, células HEK293) pode ser usada como o antígeno. A proteína pode ser conjugada a um veículo, tal como hemocianina de caramujo (*KLH - keyhole limpet*).

Anticorpos monoclonais integralmente humanos para PCSK9 são preparados usando cepas HCo7, HCo12 e HCo17 de camundongos transgênicos HuMab e a cepa KM de camundongos transcromossômicos transgênicos, cada um dos quais expressa genes de anticorpo humano. Em cada uma dessas cepas de camundongo, o gene de cadeia leve kappa de camundongo endógeno pode ser homozigualmente rompido conforme descrito em Chen e outros, 1993 *EMBO J.* 12:811-820 e o gene de cadeia pesada de camundongo endógeno pode ser homozigualmente rompido conforme descrito no Exemplo 1 do WO 01109187. Cada uma dessas cepas de camundongo carrega um transgene de cadeia leve kappa humano, KCo5, conforme descrito em Fishwild e outros, 1996 *Nature Biotechnology* 14:845-851. A cepa HCo7 carrega o transgene de cadeia pesada humana HCo7 conforme descrito nas Patentes U.S. No.s 5.545.806; 5.625.825; e 5.545.807. A

cepa HCo12 carrega o transgene de cadeia pesada humana HCo12 conforme descrito no Exemplo 2 do WO 01/09187. A cepa HCo17 carrega o transgene de cadeia pesada humana HCo17. A cepa KNM contém o transcromossomo SC20 conforme descrito no WO 02/43478.

5 Para gerar anticorpos monoclonais integralmente humanos para PCSK9, camundongos HuMab e camundongos KM são imunizados com PCSK9 recombinante purificada, fragmento de PCSK9 ou um conjugado dos mesmos (por exemplo, PCSK9-KLH) como antígeno. Esquemas de imunização gerais para camundongos HuMab são descritos em Lonberg, N. e outros
10 1994 *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. e outros, 1996 *Nature Biotechnology* 14:845-851 e WO 98/24884. Os camundongos são de 6-16 semanas de idade quando da primeira infusão de antígeno. Uma preparação recombinante purificada (5-50 µg) do antígeno é usada para imunizar os camundongos HuMab e camundongos KM na poço peritoneal, subcutaneamente
15 (Sc) ou através de injeção no coxim da pata.

Camundongos transgênicos são imunizados duas vezes com antígeno em adjuvante de Freund completo ou adjuvante Ribi ou na poço peritoneal (IP), subcutaneamente (Sc) ou através do coxim da pata (FP), seguido por 3-21 dias de imunização IP, Sc ou FP (até um total de 11 imunizações)
20 com o antígeno em adjuvante de Freund incompleto ou Ribi. A resposta imune é monitorada através de sangramentos retro-orbitais. O plasma é avaliado através de ELISA, e camundongos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-PCSK9 são usados para fusões. Camundongos são reforçados intravenosamente com antígeno 3 e 2 dias antes de sacrifício
25 e remoção do baço. Tipicamente, 10-35 fusões para cada antígeno são realizadas. Várias dúzias de camundongos são imunizadas para cada antígeno. Um total de 82 camundongos das cepas de camundongos HCo17, HCo12, HCo17 e KM são imunizados com PCSK9.

Para selecionar camundongos HuMab ou KM produzindo anticorpos que se ligam à PCSK9, soros de camundongos imunizados podem ser testados através de ELISA conforme descrito por Fishwild, D. e outros,
30 1996. Em suma, placas de microtitulação são revestidas com PCSK9 re-

combinante purificada a 1-2 µg/ml em PBS, 50 µl/poços incubados a 4° C da noite para o dia então bloqueadas com 200 µl/poço de soro de galinha 5% em PBS/Tween (0,05%). Diluições de plasma de camundongos imunizados com PCSK9 são adicionadas a cada poço e incubadas por 1-2 horas em temperatura ambiente. As placas são lavadas com PBS/Tween e então incubadas com um anticorpo policlonal Fc IgG anti-humano de cabra conjugado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) por 1 hora em temperatura ambiente. Após lavagem, as placas são desenvolvidas com substrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) e analisadas através de espectrômetro em OD 415-495. Esplenócitos de camundongos que desenvolveram os títulos mais altos de anticorpos anti-PCSK9 são usados para fusões. Fusões são realizadas e sobrenadantes de hibridoma são testados quanto à atividade de PCSK9 através de ELISA.

Os esplenócitos de camundongo, isolados dos camundongos HuMab e camundongos KM, são fundidos com PEG a uma cepa de célula de mieloma de camundongo com base em protocolos padrão. Os hibridomas resultantes são então avaliados quanto à produção de anticorpos específicos de antígeno. Suspensões de célula simples de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados são fundidas a um quarto do número de células de mieloma de camundongo de não-secreção SP2/0 (ATCC, CRL 1581) com PEG 50% (Sigma). As células são postas em placa em aproximadamente 1×10^5 /poço em placas de microtitulação de fundo plano, seguido por cerca de duas semanas de incubação em meio seletivo contendo soro bovino fetal 10%, meio condicionado P388D 1 10% (ATCC, CRL TIB-63), Origen® 3-5% (IGEN) em DMEM (Mediatech, CRL 10013, com muita glicose, L-glutamina e piruvato de sódio) mais HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, gentamicina 50 µg/ml e HAT 1x (Sigma, CRL P-7185). Após 1-2 semanas, as células são cultivadas em meio onde o HAT é substituído com HT. Poços individuais são então avaliadas através de ELISA quanto a anticorpos IgG monoclonais anti-PCSK9 humanos. Uma vez crescimento de hibridoma extensivo tendo acontecido, meio é monitorado geralmente após 10-14 dias. Os hibridomas de secreção de anticorpo são postos em placa novamente, avaliados

novamente e, se ainda positivos para IgG humano, anticorpos monoclonais anti-PCSK9 são subclonados em pelo menos duas vezes através de diluição limitante. Os subclones estáveis são então cultivados *in vitro* para gerar quantidades pequenas de anticorpo em meio de cultura de tecido para ca-
5 racterização adicional.

Geração de hibridomas produzindo anticorpos monoclonais hu- manos

Para gerar hibridomas produzindo anticorpos monoclonais hu-
manos da invenção, esplenócitos e/ou células de nó linfático de camundon-
10 gos imunizados podem ser isolados e fundidos em uma cepa de célula imor-
talizada apropriada, tal como uma cepa de célula de mieloma de camundon-
go. Os hibridomas resultantes podem ser avaliados quanto à produção de
anticorpos específicos de antígeno. Por exemplo, suspensões de célula sim-
ples de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados podem ser fundi-
15 das a um sexto do número de células de mieloma de camundongo de não-
secreção P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) com PEG 50%. As células são
postas em placa em aproximadamente 2 x 145 em placas de microtitulação
de fundo plano, seguido por uma incubação de duas semanas em meio sele-
tivo contendo Soro de Clone fetal 20%, meio condicionado "653" 18%, Ori-
20 gen[®] 5% (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato de sódio 1 mM, HEPES 5 mM,
2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de es-
treptomicina, 50 µg/ml de gentamicina e 1X HAT (Sigma; o HAT é adiciona-
do 24 horas após a fusão). Após aproximadamente duas semanas, as célu-
las podem ser cultivadas em meio onde o HAT é substituído com HT. Poços
25 individuais podem ser então avaliadas através de ELISA quanto a anticorpos
IgM e IgG monoclonais humanos. Uma vez crescimento de hibridoma exten-
sivo acontecendo, meio pode ser observado geralmente após 10-14 dias. Os
hibridomas de secreção de anticorpo podem ser postos em placa novamen-
te, avaliados novamente e se ainda positivos para IgG, os anticorpos mono-
30 clonais podem ser subclonados pelo menos duas vezes através de diluição
limitante. Os subclones estáveis podem então ser cultivados *in vitro* para
gerar quantidades pequenas de anticorpo em meio de cultura de tecido para

caracterização.

Para purificar anticorpos monoclonais humanos, hibridomas selecionados podem ser cultivados em frascos giratórios de dois litros para purificação de anticorpo monoclonal. Sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes de cromatografia de afinidade com proteína A-sefarose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). IgG eluído pode ser checado através de eletroforese em gel e cromatografia líquida de alta performance para assegurar pureza. A solução tampão pode ser trocada para PBS, e a concentração pode ser determinada através de OD₂₈₀ usando um coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser separados em aliquotas e armazenados a -80° C.

Geração de transfectomas produzindo anticorpos monoclonais

Os anticorpos da invenção podem ser também produzidos em um transfectoma de célula hospedeiro usando, por exemplo, uma combinação de técnicas de DNA recombinante e métodos de transfecção de gene como é bem conhecido na técnica (por exemplo, Morrison, 1985 *Science* 229:1202).

Por exemplo, para expressar os anticorpos, ou fragmentos de anticorpo dos mesmos, DNAs codificando cadeias leves e pesadas de comprimento parcial ou integral, podem ser obtidos através de técnicas de biologia molecular padrão (por exemplo, amplificação por PCR ou clonagem de cDNA usando um hibridoma que expressa o anticorpo de interesse) e os DNAs podem ser inseridos nos vetores de expressão de modo que os genes são operativamente ligados a sequências de controle transcripcional e traducional. Neste contexto, o termo "operativamente ligado" pretende significar que um gene de anticorpo é ligado a um vetor de modo que sequências de controle transcripcional e traducional dentro do vetor servem sua função pretendida de regulação da transcrição e tradução do gene de anticorpo. O vetor de expressão e as sequências de controle de expressão são escolhidos para serem compatíveis com a célula hospedeiro de expressão usada. O gene de cadeia leve de anticorpo e o gene de cadeia pesada de anticorpo podem ser inseridos em vetor separado ou, mais tipicamente, ambos os ge-

nes são inseridos no mesmo vetor de expressão. Os genes de anticorpo são inseridos no vetor de expressão através de métodos padrão (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementares no fragmento de gene de anticorpo e vetor ou ligação de extremidade abrupta se quaisquer sítios de restrição estiverem presentes). As regiões variáveis de cadeias leve e pesada dos anticorpos descritos aqui podem ser usadas para criar genes de anticorpo de comprimento integral de qualquer isotipo de anticorpo inserindo-os em vetores de expressão já codificando regiões constantes de cadeia pesada e regiões constantes de cadeia leve do isotipo desejado de modo que o segmento V_H está operativamente ligado ao(s) segmento(s) CH) dentro do vetor e o segmento V_L está operativamente ligado ao segmento CL dentro do vetor. Adicionalmente ou alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode codificar um peptídeo de sinal que facilita a secreção da cadeia de anticorpo a partir de uma célula hospedeiro. O gene da cadeia de anticorpo pode ser clonado no vetor de modo que o peptídeo de sinal é ligado em estrutura ao terminal amino do gene da cadeia de anticorpo. O peptídeo de sinal pode ser um peptídeo de sinal de imunoglobulina ou um peptídeo de sinal heterólogo (isto é, um peptídeo de sinal de uma proteína de não-imunoglobulina).

Em adição aos genes de cadeia de anticorpo, os vetores de expressão recombinantes da invenção carregam sequências reguladoras que controlam a expressão dos genes da cadeia de anticorpo em uma célula hospedeiro. O termo "sequência reguladora" pretende incluir promotores, aumentadores e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação) que controlam a transcrição ou tradução dos genes de cadeia de anticorpo. Tais sequências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel (*Gene Expression Technology, 1990 Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA). Será compreendido por aqueles versados na técnica que o projeto do vetor de expressão, incluindo a seleção de sequências reguladoras, pode depender de fatores tais como a escolha da célula hospedeiro a ser transformada, o nível de expressão de proteína desejado, etc. Sequências reguladoras para expressão de célula

hospedeiro de mamífero incluem elementos virais que direcionam níveis altos de expressão de proteína em células de mamífero, tais como promotores e/ou aumentadores derivados de citomegalovírus (CMV), Vírus Simio 40 (SV40), adenovírus (por exemplo, o promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP)) e políoma. Alternativamente, sequências reguladoras não-virais podem ser usadas, tal como o promotor da ubiquitina ou promotor da P-globina. Ainda, elementos reguladores compostos de sequências de fontes diferentes, tal como o sistema promotor de SRa, que contém sequências do promotor precoce de SV40 e a repetição terminal longa de vírus da leucemia tipo 1 de célula T humana (Takebe e outros, 1988 *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

Em adição aos genes de cadeia de anticorpo e sequências reguladoras, os vetores de expressão recombinantes da invenção podem carregar sequências adicionais, tal como sequências que regulam replicação do vetor em células hospedeiro (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene rotulador selecionável facilita seleção de células hospedeiro onde o vetor foi introduzido (vide, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 4.399.216; 4.634.665; e 5.179.017, todos da Axel e outros). Por exemplo, tipicamente o gene rotulador selecionável confere resistência a fármacos, tal como G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeiro na qual o vetor foi introduzido. Genes marcadores selecionáveis incluem o gene da dihidrofolato redutase (DHFR) (para uso em células hospedeiro de dhfr com seleção/amplificação de metotrexato) e o gene neo (para seleção de G418).

Para expressão das cadeias leves e pesadas, o(s) vetor(es) de expressão codificando as cadeias pesadas e leves é(são) transfectado(s) em uma célula hospedeiro através de técnicas padrão. As várias formas do termo "transfecção" pretendem compreender uma ampla variedade de técnicas geralmente usadas para a introdução de DNA exógeno em uma célula hospedeiro procariótica ou eucariótica, por exemplo, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção de DEAE-dextrano e similar. É teoricamente possível expressar os anticorpos da invenção em células hospedeiro ou procarióticas ou eucarióticas. Expressão de anticorpos em células eucarióticas,

em particular células hospedeiro de mamífero, é discutida porque tais células eucarióticas, e em particular células de mamífero, são mais prováveis do que células procarióticas de se reunirem e secretar um anticorpo apropriadamente dobrado e imunologicamente ativo. Expressão procariótica de genes de anticorpos foi relatada ser ineficaz para produção de altos rendimentos de anticorpo ativo (Boss e Wood, 1985 *Immunology Today* 6:12-13).

Células hospedeiro de mamífero para expressão dos anticorpos recombinantes da invenção incluem Ovírio de Hamster Chinês (células CHO) (incluindo células dhfr- CHO, descritas em Urlaub e Chasin, 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220 usadas com um rotulador selecionável de DH FR, por exemplo, conforme descrito em Kaufman e Sharp, 1982 *Mol. Biol.* 159:601-621, células de mieloma de NOS, células COS e células SP2. Em particular, para uso com células de mieloma NOS, outro sistema de expressão é o sistema de expressão de gene GS mostrado no WO 87/04462, no WO 89/01036 e na EP 338.841. Quando vetores de expressão recombinantes codificando genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeiro de mamífero, os anticorpos são produzidos através de cultura das células hospedeiro por um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiro ou secreção do anticorpo no meio de cultura onde as células hospedeiro são cultivadas. Anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura usando métodos de purificação de proteína padrão.

Moléculas biespecíficas

Em outro aspecto, a presente invenção refere-se a moléculas biespecíficas compreendendo uma molécula de ligação à PCSK9 (por exemplo, um anticorpo anti-PCSK9 ou um fragmento do mesmo) da invenção. Uma molécula de ligação à PCSK9 da invenção pode ser derivatizada ou ligada a outra molécula funcional, por exemplo, outro peptídeo ou proteína (por exemplo, outro anticorpo ou ligante para um receptor) para gerar uma molécula biespecífica que se liga a pelo menos dois sítios de ligação diferentes ou moléculas alvo. A molécula de ligação à PCSK9 da invenção pode na verdade ser derivatizada ou ligada a mais de uma outra molécula para gerar

moléculas multiespecíficas que se ligam a mais do que dois sítios de ligação e/ou moléculas alvo diferentes; tais moléculas multiespecíficas pretendem ser compreendidas pelo termo "molécula biespecífica" conforme aqui usado. Para criar uma molécula biespecífica da invenção, um anticorpo da invenção

5 pode ser funcionalmente ligado (por exemplo, através de acoplamento químico, fusão genética, associação não-covalente ou de outro modo) a uma ou mais outras moléculas de ligação, tal como outro anticorpo, fragmento de anticorpo, peptídeo ou mimético de ligação, de modo que uma molécula biespecífica resulta.

10 Deste modo, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas compreendendo pelo menos uma primeira especificidade de ligação para PCSK9 e uma segunda especificidade de ligação para um segundo epitopo alvo.

Em uma modalidade, as moléculas biespecíficas da invenção

15 compreendem como uma especificidade de ligação pelo menos um anticorpo, ou um fragmento de anticorpo do mesmo, incluindo, por exemplo, um Fab, Fab', F(ab')₂, Fv ou um Fv de cadeia simples. O anticorpo pode ser também um dímero de cadeia leve ou cadeia pesada ou qualquer fragmento mínimo do mesmo tal como um Fv ou um construto de cadeia única conforme descrito em Ladner e outros, Patente U.S. No. 4.946.778, cujos conteúdos

20 estão aqui expressamente incorporados a título de referência.

As moléculas biespecíficas da presente invenção podem ser preparadas através de conjugação das especificidades de ligação constituintes usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, cada especificidade

25 de de ligação da molécula biespecífica pode ser gerada separadamente e então conjugadas uma à outra. Quando as especificidades de ligação são proteínas ou peptídeos, uma variedade de agentes de acoplamento ou reticulação pode ser usada para conjugação covalente. Exemplos de agentes de reticulação incluem proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-

30 tioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), o-fenilenodimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP) e sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) cicl-hoexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (vi-

de, por exemplo, Karpovsky e outros, 1984 *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu e outros, 1985 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Outros métodos incluem aqueles descritos em Paulus, 1985 *Behring Inst. Mitt.* 78, 118-132; Brennan e outros, 1985 *Science* 229:81-83) e Glennie e outros, 1987 *J. Immunol.* 139:2367-2375). Agentes de conjugação são SATA e sulfó-SMCC, ambos disponíveis da Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Quando as especificidades de ligação são anticorpos, eles podem ser conjugados através de ligação sulfidríla das regiões de união C-terminais das duas cadeias pesadas. Em uma modalidade particular, a região de união é modificada para conter um número ímpar de resíduos sulfidríla, por exemplo, um, antes da conjugação.

Alternativamente, ambas as especificidades de ligação podem ser codificadas no mesmo vetor e expressas e montadas na mesma célula hospedeiro. Este método é particularmente útil onde a molécula bioespecífica for uma mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ ou ligante x proteína de fusão de Fab. Uma molécula bioespecífica da invenção pode ser uma molécula de cadeia única compreendendo um anticorpo de cadeia única e um determinante de ligação, ou uma molécula bioespecífica de cadeia única compreendendo dois determinantes de ligação. Moléculas bioespecíficas podem compreender pelo menos duas moléculas de cadeia única. Métodos para preparação de moléculas bioespecíficas são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 5.260.203; 5.455.030; 4.881.175; 5.132.405; 5.091.513; 5.476.786; 5.013.653; 5.258.498, e 5.482.858.

Ligação das moléculas bioespecíficas a seus alvos específicos pode ser confirmada por, por exemplo, ensaio imunabsorvente ligado à enzima (ELISA), radioimunoensaio (REA), análise FACS, bioensaio (por exemplo, inibição de crescimento) ou ensaio *Western Blot*. Cada um desses ensaios geralmente detecta a presença de complexos proteína-anticorpo de interesse particular empregando um reagente rotulado (por exemplo, um anticorpo) específico para o complexo de interesse.

Ensaio funcionais

As características funcionais de moléculas de ligação à PCSK9

podem ser testadas *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, moléculas de ligação podem ser testadas quanto à habilidade em inibir interação de PCSK9 com LDL-R, inibição de efeitos dependentes de PCSK9 sobre LDL-R (por exemplo, absorção mediada por LDL-R de LDL-c), inibição de atividade proteolítica de PCSK9 e diminuição de LDL-c *in vivo*.

Ligação de PCSK9 à LDL-R pode ser detectada usando Biacore® através da imobilização de LDL-R para um apoio sólido e detecção de PCSK9 solúvel se ligando à LDL-R. Alternativamente, PCSK9 pode ser imobilizada e ligação a LDL-R pode ser detectada. Ligação de PCSK9/LDL-R pode ser também analisada através de ELISA (por exemplo, através da detecção de PCSK9 se ligando à LDL-R imobilizada) ou através de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET). Para realizar FRET, PCSK9 rotulada com fluoróforo se ligando à LDL-R em solução pode ser detectada (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 5.631.169).

PCSK9 se ligando à LDL-R foi detectada através de coimunoprecipitação (Lagace e outros, 2006 *J. Clin. Inv.* 116(11):2995-3005). Para examinar PCSK9-LDL-R se ligando desta maneira, células HepG2 são cultivadas em meio sem esterois por 18 horas. PCSK9 purificada é adicionada ao meio na presença de cloroquina a 0,1 mM e as células são incubadas por uma hora. As células são lisadas em detergente suave (digitonina 1% p/v). PCSK9 ou LDL-R é imunoprecipitada de lisatos de célula, separada através de SDS-PAGE e *immunoblotted* para detectar a presença de LDL-R ou PCSK9 coimunoprecipitada, respectivamente (Lagace e outros, 2006 *J. Clin. Inv.* 116(11):2995-3005). Esses ensaios podem ser conduzidos com uma forma mutante de PCSK9 que se liga à LDL-R com uma avidéz maior (por exemplo, hPCSK9 D374Y) (Lagace e outros, 2006, *supra*).

Hepatócitos expressam LDL-R na superfície celular. Adição de PCSK9 purificada a células hepáticas cultivadas (por exemplo, células HepG2, ATCC, HB-8065) produz uma diminuição na expressão de LDL-R de uma maneira dependente da dose e do tempo (Lagace e outros, 2006 *J. Clin. Inv.* 116(11):2995-3005). Moléculas de ligação à PCSK9 podem ser testadas quanto à habilidade em aumentar os níveis de LDL-R por hepatóci-

tos. Por exemplo, células HepG2 são cultivadas em meio sem esterois (DMEM suplementado com penicilina 100 U/ml, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina e 1 g/l de glicose, soro deficiente em lipoproteína de bezerro recém-nascido 5% (vol/vol) (NCLPDS), 10 µM de compactina de sódio e 50 µM de mevalonato de sódio) por 18 horas para induzir expressão de LDL-R. PCSK9 purificada (5 µg/ml) é adicionada ao meio. Níveis de LDL-R em células coletadas em 0, 0,5, 1, 2 e 4 horas após adição de PCSK9 são determinados (Lagace e outros, 2006, *J. Clin. Inv.* 116(11):2995-3005). Níveis de LDL-R podem ser determinados através de citometria de fluxo, FRET, *immunoblotting* ou outros meios.

Absorção de LDL-c por células (por exemplo, células HepG2) pode ser medida usando LDL-c fluorescentemente rotulada, Dil-LDL (3,3'-dioctadecilindocarbocianina-lipoproteína de densidade baixa) conforme descrito por Stephan e Yurachek (1993, *J. Lipid Res.* 34:325-330). Em suma, as células são incubadas em cultura com Dil-LDL (20-100 µg de proteína/ml) a 37° C por 2 horas. As células são lavadas, lisadas e a concentração de Dil-LDL internalizada é quantificada usando um espectrofluorômetro. Absorção de LDL-c pode ser medida em células contatadas com um agente de ligação à PCSK9 (antes do e/ou durante o período onde Dil-LDL está presente na cultura celular).

Atividade proteolítica de PCSK9 pode ser medida *in vitro* usando substratos de peptídeo sintéticos. Vide, por exemplo, Seidah e outros, 2003 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(3):928-933. Em um método exemplar, PCSK9 purificada é incubada a 37° C por 3-18 horas com 50 µM de Suc-RPFHLLVY-MCA (4-metilcoumarin-7-amida) em Tris/Mes 25 mM, pH 7,4 + CaCl₂ 2,5 a mM e SDS 0,5%. Análise de fluorescência e tempo de voo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz dos produtos é usada para detectar produtos de clivagem (Seidah e outros, 2003 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(3):928-933; Basak e outros, 2002 *FEBS Lett.* 514:333-339). Este ensaio pode ser usado para detectar diferenças em eficiência de clivagem na presença de moléculas de ligação à PCSK9.

Camundongos transgênicos superexpressando PCSK9 humana

em fígado têm níveis aumentados de LDL-c no plasma com relação a camundongos não-transgênicos (Lagace e outros, 2006 *J. Clin. Inv.* 116(11):2995-3005). Vide também Maxwell e Breslow, 2004 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:7100, descrevendo superexpressão de PCSK9 usando um vetor de adenovírus em camundongos. Camundongos PCSK9^{-/-} foram produzidos (Rashid e outros, 2005 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102(5):5374-5379). Esses camundongos podem ser geneticamente modificados para expressar um transgene hPCSK9. Moléculas de ligação à PCSK9 podem ser testadas em qualquer um desses modelos, ou em animais que não são geneticamente modificados, quanto à habilidade em remover ou reduzir colesterol total e/ou LDL-c.

A cinética de remoção de LDL de plasma pode ser determinada injetando animais com LDL rotulado com [¹²⁵I], obtendo amostras de sangue em 0, 5, 10, 15 e 30 minutos após injeção e quantificação de LDL-[¹²⁵I] nas amostras (Rashid e outros, 2005 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102(5):5374-5379). A taxa de remoção de LDL é aumentada em camundongos PCSK9^{-/-} com relação aos camundongos do tipo selvagem (Rashid e outros, 2005 *supra*). Remoção de LDL aumentada em animais administrados com uma molécula de ligação à PCSK9 indica que o agente inibe atividade de PCSK9 *in vivo*.

Diminuições no colesterol no plasma, triglicerídeos no plasma ou LDL-n total em resposta a tratamento com uma molécula de ligação à PCSK9 são indicativas de eficácia terapêutica da molécula de ligação à PCSK9. Perfis de colesterol e lipídeo podem ser determinados através de meios colorimétricos, cromatográficos gás-líquido ou enzimáticos usando estojos comercialmente disponíveis.

Composições farmacêuticas

Em outro aspecto, a presente invenção provê uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo uma ou uma combinação de moléculas de ligação à PCSK9 (por exemplo, anticorpos monoclonais ou porção(ões) de ligação de antígeno dos mesmos), da presente invenção, formulados juntos com um veículo farmacêuticamente aceitável. Tais composições podem incluir um ou uma combinação de (por exemplo,

duas ou mais diferentes) moléculas de ligação. Por exemplo, uma composição farmacêutica da invenção pode compreender uma combinação de anticorpos ou agentes que se ligam a epitopos diferentes no antígeno-alvo ou que têm atividades complementares.

5 As composições farmacêuticas da invenção podem ser também administradas em terapia de combinação, isto é, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir um anticorpo anti-PCSK9 combinado com pelo menos outro agente de redução de colesterol. Exemplos de agentes terapêuticos que podem ser usados em terapia
10 de combinação são descritos em mais detalhes abaixo na seção de usos dos agentes da invenção.

Conforme aqui usado, "veículo farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardo de
15 absorção e similar que são fisiologicamente compatíveis. O veículo deve ser adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidermal (por exemplo, através de injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo pode ser revestido em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condi-
20 ções naturais que podem inativar o composto.

Os compostos farmacêuticos da invenção podem incluir um ou mais sais farmacêuticamente aceitáveis. Um "sal farmacêuticamente aceitável" refere-se a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto de origem e não causa quaisquer efeitos toxicológicos (vide, por exemplo,
25 Berge, S.M. e outros, 1977 *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição ácidos e sais de adição de base. Sais de adição ácidos incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não-tóxicos, tais como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e similar, bem como de ácidos orgânicos não-tóxicos tal como ácidos mono- e di-
30 carboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos substituídos por fenila, ácidos hidróxi alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e similar. Sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais alca-

lino-terrosos, tal como sódio, potássio, magnésio, cálcio e similar, bem como de aminas orgânicas não-tóxicas, tal como N,N'-dibenziletlenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e similar.

5 Uma composição farmacêutica da invenção também pode incluir um antioxidante farmaceuticamente aceitável. Exemplos de antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis incluem: antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfito de sódio, metabissulfito de sódio, sulfeto de sódio e similar; antioxidantes solúveis em óleo, tal
10 como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil galato, alfa-tocoferol e similar; e agentes de que-
lação de metal, tal como ácido cítrico, ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e similar.

Exemplos de veículos aquosos e não-aquosos adequados que
15 podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção inclu-
em água, etanol, polióis (tais como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol e similar) e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, tal como óleo
de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, tal como oleato de etila. Fluidez a-
propriada pode ser mantida, por exemplo, através do uso de materiais de
20 revestimento, tal como lecitina, através da manutenção do tamanho de parti-
cula requerido no caso de dispersões e através do uso de tensoativos.

Essas composições podem também conter adjuvantes tais como
conservantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes e agentes de
dispersão. Prevenção de presença de micro-organismos pode ser assegura-
25 da ambos através de procedimentos de esterilização, *supra*, e através da
inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, pa-
rabeno, clorobutanol, ácido fenol ascórbico e similar. Pode ser também de-
sejável incluir agentes isotônicos, tal como açúcares, cloreto de sódio e simi-
lar nas composições. Ainda, absorção prolongada da forma farmacêutica
30 injetável pode ser conseguida através da inclusão de agentes que retardam
absorção tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

Veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem soluções ou dis-

persões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersão injetáveis estéreis. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacologicamente ativas é conhecido na técnica. Exceto até o ponto que qualquer meio ou agente convencional for incompatível com o composto ativo, uso do mesmo nas composições farmacêuticas da invenção é compreendido. Compostos ativos suplementares podem ser também incorporados às composições.

Composições terapêuticas devem ser tipicamente estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. As composições podem ser formuladas como uma solução, microemulsão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para concentração alta de fármaco. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido e similar) e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, através do uso de um revestimento tal como lecitina, através da manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e através do uso de tensoativos. Em muitos casos, uma pessoa pode incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tal como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. Absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida incluindo na composição um agente que retarda absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas através da incorporação do composto ativo na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, conforme requerido, seguido por microfiltração de esterilização. Em geral, dispersões são preparadas através da incorporação do composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação são secagem a vácuo e secagem com congelamento (liofilização) que dão um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional

de uma solução previamente filtrada estéril do mesmo.

A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material veículo para produzir uma forma de dosagem única vai variar dependendo do indivíduo sendo tratado e do modo de administração particular. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material veículo para produzir uma forma de dosagem única vai geralmente ser aquela quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Em geral, de cem por cento, esta quantidade vai variar de a partir de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento de ingrediente ativo, de a partir de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por cento ou de a partir de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento de ingrediente ativo em combinação com um veículo farmacologicamente aceitável.

Regimes de dosagem são ajustados para prover a resposta desejada ótima (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um bolo único pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas com o tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais em forma de unidade de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Forma unitária de dosagem conforme aqui usado refere-se a unidades fisicamente separadas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido. As especificações para as formas de unidade de dosagem da invenção são ditadas por e diretamente dependente das características únicas do composto ativo e do efeito terapêutico particular a ser atingido e as limitações inerentes na técnica de composição tal como um composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Para administração do anticorpo, a dosagem varia de a partir de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg e mais geralmente 0,01 a 5 mg/kg do peso do corpo do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser 0,3 mg/kg de

peso do corpo, 1 mg/kg de peso do corpo, 3 mg/kg de peso do corpo, 5 mg/kg de peso do corpo ou 10 mg/kg de peso do corpo ou dentro da faixa de 1-10 mg/kg. Um regime de tratamento exemplar exige administração uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três se-
5 manas, uma vez a cada quatro semanas, uma vez por mês, uma vez a cada 3 meses ou uma vez a cada três a 6 meses. Regimes de dosagem para molécula de ligação à PCSK9 da invenção incluem 1 mg/kg de peso do corpo ou 3 mg/kg de peso do corpo através de administração intravenosa, com o anticorpo sendo dado usando um dos programas de dosagem que seguem:
10 a cada quatro semanas para seis dosagens, então a cada três meses; a cada três semanas; 3 mg/kg de peso do corpo uma vez seguido por 1 mg/kg de peso do corpo a cada três semanas.

Em alguns métodos, duas ou mais moléculas de ligação (por exemplo, anticorpos monoclonais) com especificidades de ligação diferentes
15 são administradas simultaneamente, casos onde a dosagem de cada anticorpo administrado se encaixa nas faixas indicadas. A molécula de ligação à PCSK9 é geralmente administrada em ocasiões múltiplas. Intervalos entre dosagens únicas podem ser, por exemplo, semanalmente, mensalmente, a cada três meses ou anualmente. Intervalos podem ser também irregulares
20 conforme indicado através da medição de níveis sanguíneos de molécula de ligação à PCSK9 no paciente. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para atingir uma concentração no plasma da molécula de ligação à PCSK9 de cerca de 1-1000 µg/ml e em alguns métodos cerca de 25-300 µg/ml.

Alternativamente, uma molécula de ligação à PCSK9 pode ser
25 administrada como uma formulação de liberação sustentada, caso onde administração menos freqüente é requerida. Dosagem e freqüência variam dependendo da meia-vida da molécula de ligação à PCSK9 no paciente. Em geral, anticorpos humanos mostram a meia-vida mais longa, seguido por anticorpos humanizados, anticorpos projetados humanizados, anticorpos
30 quiméricos e anticorpos não-humanos. A dosagem e a freqüência de administração podem variar dependendo de se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é ad-

ministrada em intervalos relativamente infreqüentes durante um período de tempo longo. Alguns pacientes continuam a receber tratamento para o resto de suas vidas. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta em intervalos relativamente curtos é algumas vezes requerida até progre-

5 são da doença ser reduzida ou terminada ou até o paciente mostrar melhora parcial ou completa de sintomas de doença. Em seguida, o paciente pode ser administrado com um regime profilático.

Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados de modo a

10 obter uma quantidade do ingrediente ativo que é eficaz para obter a resposta terapêutica desejada para um paciente, composição e modo de administração particular, sem ser tóxica para o paciente. O nível de dosagem selecionado vai depender de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a

15 atividade das composições particulares da presente invenção empregadas, ou do éster, sal ou amida das mesmas, a via de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção do composto particular sendo empregado, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares empregadas, a idade, se-

20 xto, peso, condição, saúde geral e história média anterior do paciente sendo tratado e fatores similares bem conhecidos na técnica médica.

Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" de molécula de ligação à PCSK9 da invenção pode resultar em uma diminuição na severidade de sintomas de doença (por exemplo, uma diminuição em colesterol no plasma ou uma diminuição em um sintoma de um distúrbio relacionado com coleste-

25 rol), um aumento em frequência e duração de períodos livres de sintoma de doença ou uma prevenção de debilidade ou incapacidade devido à aflição da doença.

Uma composição da presente invenção pode ser administrada através de uma ou mais vias de administração usando um ou mais de uma

30 variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será compreendido pelo versado na técnica, a via e/ou modo de administração vão variar dependendo dos resultados desejados. Vias de administração para moléculas de

ligação à PCSK9 da invenção incluem intravenosa, intramuscular, intradermal, intraperitoneal, subcutânea, espinhal ou outras vias de administração parenterais, por exemplo, através de injeção ou infusão. A expressão "administração parenteral" conforme aqui usado significa modos de administração outros que não administrações enteral e tópica, geralmente através de injeção, e inclui, sem limitação, injeção e infusão intravenosas, intramusculares, intra-arteriais, intratecais, intracapsulares, intraorbitais, intracardiacas, intradermais, intraperitoneais, transtraqueais, subcutâneas, subcuticulares, intraarticulares, subcapsulares, subaraquínóides, intra-espinhais, epidurais e intrasternais.

Alternativamente, uma molécula de ligação à PCSK9 da invenção pode ser administrada através de uma via não-parenteral, tal como uma via de administração tópica, epidermal ou mucosal, por exemplo, intranasalmente, oralmente, vaginalmente, retalmente, sublingualmente ou topicamente.

Os compostos ativos podem ser preparados com veículos que vão proteger o composto contra liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastos transdermais e sistemas de aplicação microencapsulados. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, podem ser usados, tal como acetato de etileno vinila, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos daqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova York, 1978.

Composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma modalidade, uma composição terapêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmico sem agulha, tal como os dispositivos mostrados na Patente U.S. No. 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824 ou 4.596.556. Exemplos de implantes e módulos bem conhecidos úteis na presente invenção incluem: Patente U.S. No. 4.487.603,

que mostra uma bomba de microinfusão implantável para aplicação de medicação em uma taxa controlada; a Patente U.S. No. 4.486.194, que mostra um dispositivo terapêutico para administração de medicamentos através da pele; Patente U.S. No. 4.447.233, que mostra uma bomba de infusão de medicamento para aplicação de medicação em uma taxa de infusão precisa; Patente U.S. No. 4.447.224, que mostra um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para aplicação de fármaco contínua; Patente U.S. No. 4.439.196, que mostra um sistema de aplicação de fármaco osmótico tendo compartimentos de câmara múltiplos; e Patente U.S. No. 4.475.196, que mostra um sistema de aplicação de fármaco osmótico. Essas patentes são aqui incorporadas a título de referência. Muitos outros tais implantes, sistemas de aplicação e módulos são conhecidos daqueles versados na técnica.

Em certas modalidades, as moléculas de ligação à PCSK9 da invenção podem ser formuladas para assegurar distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira sangue-cérebro (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para assegurar que os compostos terapêuticos da invenção cruzem a BBB (se desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para métodos de fabricação de lipossomas, vide Patentes U.S. Nos. 4.522.811; 5.374.548; e 5.399.331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais porções que são seletivamente transportadas para células ou órgãos específicos, então aumentam a aplicação de fármaco direcionada (vide, por exemplo, V.V. Ranade, 1989 *J. Cline Pharmacol.* 29:685). Porções direcionadas exemplares incluem folato ou biotina (vide, por exemplo, Patente U.S. 5.416.016 para Low e outros); manosídeos (Umezawa e outros, 1988 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticorpos (P.G. Bloeman e outros, 1995 *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais e outros, 1995 *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de proteína A tensoativo (Briscoe e outros, 1995 *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier e outros, 1994 *J. Biol. Chem.* 269:9090); vide também K. Keinänen; M.L. Laukkanen, 1994 *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler, 1994 *Immuno-methods* 4:273.

Usos e métodos da invenção

As moléculas de ligação à PCSK9 descritas aqui têm utilidades de diagnóstico e terapêuticas *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, essas moléculas podem ser administradas a células em cultura, por exemplo, *in vitro* ou *in vivo*, ou em um indivíduo, por exemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir ou diagnosticar uma variedade de distúrbios. Moléculas de ligação à PCSK9 são particularmente adequadas para tratamento de pacientes humanos tendo, ou sob risco de, colesterol elevado ou uma condição associada com colesterol elevado, por exemplo, um distúrbio de lipídeo (por exemplo, hiperlipidemia, hiperlipidemia tipo I, tipo II, tipo III, tipo IV ou tipo V, hipertrigliceridemia secundária, hipercolesterolemia, xantomatose, deficiência de colesterol acetiltransferase). Moléculas de ligação à PCSK9 são também adequadas para tratamento de pacientes humanos tendo condições ateroscleróticas (por exemplo, aterosclerose), doença da artéria coronária, doença cardiovascular e pacientes sob risco desses distúrbios, por exemplo, devido à presença de um ou mais fatores de risco (por exemplo, hipertensão, fumo de cigarro, diabetes, obesidade ou hiper-homocisteinemia).

Quando moléculas de ligação à PCSK9 são administradas junto com outro agente, os dois podem ser administrados seqüencialmente em qualquer ordem ou simultaneamente. Em algumas modalidades, uma molécula de ligação à PCSK9 é administrada a um indivíduo que está também recebendo terapia com um segundo agente (por exemplo, um segundo agente de redução de colesterol). Agentes de redução de colesterol incluem estatinas, sequestrantes de ácido da bile, niacina, derivados de ácido fibríco e ácidos alfa-ômega dicarboxílicos de cadeia longa. Estatinas inibem síntese de colesterol ao bloquear HMGCoA, uma enzima-chave em biossíntese de colesterol. Exemplos de estatinas são lovastatina, pravastatina, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina e simvastatina. Sequestrantes de ácido da bile interrompem a reciclagem de ácidos da bile a partir do intestino para o fígado. Exemplos desses agentes são colestiramina e cloridrato de colestipol. Exemplos de derivados do ácido fibríco são clofibrato e gemfibrozil. Ácidos alfa, ômega-dicarboxílicos de cadeia longa são descritos, por exemplo, por Bisgaier e outros, 1998, *J. Lipid Res.* 39:17-30; WO 98/30530; Patente U.S.

No. 4.689.344; WO 99/00116; Patente U.S. No. 5.756.344; Patente U.S. No. 3.773.946; Patente U.S. No. 4.689.344; Patente U.S. No. 4.689.344; Patente U.S. No. 4.689.344; e Patente U.S. No. 3.930.024); éteres (por exemplo, Patente U.S. No. 4.711.896; Patente U.S. No. 5.756.544; Patente U.S. No. 6.506.799). Fosfatos de dolicol (Patente U.S. No. 4.613.593) e derivados de azolidinodiona (Patente U.S. No. 4.287.200) podem ser também usados para reduzir níveis de colesterol.

Um regime de terapia de combinação pode ser aditivo ou ele pode produzir resultados sinérgicos (por exemplo, redução em colesterol mais do que esperado para o uso combinado dos dois agentes). Em algumas modalidades, terapia de combinação com uma molécula de ligação à PCSK9 e uma estatina produz resultados sinérgicos (por exemplo, reduções sinérgicas em colesterol). Em alguns indivíduos, isto pode permitir redução em dosagem de estatina para atingir os níveis de colesterol desejados.

Moléculas de ligação à PCSK9 são úteis para indivíduos que são intolerantes à terapia com outro agente de redução de colesterol ou para quem terapia com outro agente de redução de colesterol produziu resultados inadequados (por exemplo, indivíduos que sentem redução de LDL-c insuficiente sob terapia com estatina).

Uma molécula de ligação à PCSK9 descrita aqui pode ser administrada a um indivíduo com colesterol elevado (por exemplo, um indivíduo humano com níveis de colesterol no plasma totais de 200 mg/dl ou mais, um indivíduo humano com níveis de LDL-c de 160 mg/dl ou mais).

Em uma modalidade, as moléculas de ligação da invenção podem ser usadas para detectar níveis de PCSK9. Isto pode ser conseguido, por exemplo, através de contato de uma amostra (tal como uma amostra *in vitro*) e uma amostra controle com a molécula de ligação à PCSK9 sob certas condições que permitem a formação de um complexo entre a molécula de ligação de PCSK9. Quaisquer complexos formados entre a molécula e PCSK9 são detectados e comparados na amostra e o controle. Por exemplo, métodos de detecção padrão, bem conhecidos no campo, tal como ensaios ELISA e citometria de fluxo, podem ser realizados usando as composições

da invenção.

Deste modo, em um aspecto, a invenção provê ainda métodos para detecção da presença de PCSK9 (por exemplo, hPCSK9) em uma amostra, ou medição da quantidade de PCSK9, compreendendo contato da amostra, e uma amostra controle, com uma molécula de ligação à PCSK9 (por exemplo, um anticorpo) da invenção, sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo ou porção do mesmo e PCSK9. A formação de um complexo é então detectada, onde uma diferença em formação de complexo entre a amostra comparado com a amostra controle é indicativa da presença de PCSK9 na amostra.

Também dentro do escopo da invenção estão estojos consistindo nas composições da invenção e instruções para uso. O estojo pode conter ainda pelo menos um reagente adicional ou um ou mais anticorpos adicionais da invenção (por exemplo, um anticorpo tendo uma atividade complementar que se liga a um epitopo no antígeno-alvo diferente do primeiro anticorpo). Estojos tipicamente incluem um rótulo indicando o uso pretendido dos conteúdos do estojo. O termo rótulo inclui qualquer material de escrita ou gravado fornecido no ou com o estojo ou que de outro modo acompanhe o estojo.

A invenção tendo sido integralmente descrita é ilustrada mais pelos exemplos e reivindicações que seguem, que são ilustrativos e não pretendem ser mais limitantes. Aqueles versados na técnica vão reconhecer ou serão capazes de averiguar, usando não mais do que experimentação de rotina, vários equivalentes para os procedimentos específicos descritos aqui. Tais equivalentes estão dentro do escopo da presente invenção e reivindicações. Os teores de todas as referências, incluindo patentes emitidas e pedidos de patente publicados, mencionados em todo o presente relatório descritivo são aqui incorporados a título de referência.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Geração de anticorpos humanos através de exibição de fago

Para a geração de anticorpos contra hPCSK9, seleções com a

biblioteca de exibição de fago MorphoSys HuCAL GOLD[®] são realizadas. HuCAL GOLD[®] é uma biblioteca de Fab baseada no conceito de HuCAL[®] onde todas as seis CDRs são diversificadas, e que emprega a tecnologia CysDisplay[®] para ligação de fragmentos Fab à superfície do fago (Knappik e outros, 2000 *J. Mol. Biol.* 296:57-86; Krebs e outros, 2001 *J. Immunol. Methods* 254:67-84; Rauchenberger e outros, 2003 *J. Biol. Chem.* 278(40):38194-38205; WO 01/05950, Löhning, 2001).

Resgate de fagemídeo, amplificação de fago e purificação

A biblioteca HuCAL GOLD[®] é amplificada em meio 2xYT contendo 34 µg/ml de cloranfenicol e 1% de glicose (2xYT-CG). Após infecção com fagos auxiliares hiperfago em um OD_{600nm} de 0,5 (30 minutos a 37° C sem agitação; 30 minutos a 37° C com agitação a 250 rpm), as células são giradas (4120 g; 5 minutos; 4° C), ressuspensas em 2x YT/34 µg/ml de cloranfenicol / 50 µg/ml de canamicina / IPTG 0,25 mM e cultivadas da noite para o dia a 22° C. Fagos são precipitados com PEG duas vezes a partir do sobrenadante, ressuspensos em PBS / glicerol 20% e armazenados a -80° C.

Amplificação de fago entre duas rodadas de "panning" é conduzida como segue: células TG1 de *E. coli* de fase mid-log são infectadas com fagos eluídos e postas em placa em LB-ágar suplementado com 1% de glicose e 34 µg/ml de cloranfenicol (placas LB-CG). Após incubação da noite para o dia a 30° C, as colônias TG1 são raspadas das placas de ágar e usadas para inocular 2x YT-CG até um OD_{600nm} de 0,5 ser atingido e fagos auxiliares hiperfago adicionados para infecção conforme acima descrito.

"panning"s com HuCAL GOLD[®]

Para a seleção de anticorpos reconhecendo hPCSK9 duas estratégias de "panning" diferentes foram aplicadas. Sumarizando, anticorpos de fago HuCAL GOLD[®] são divididos em quatro grupos compreendendo combinações diferentes de genes máster VH (grupo 1: VH1/5 λκ, grupo 2: VH3 λκ, grupo 3: VH2/4/6 λκ, grupo 4: VH1-6 λκ). Esses grupos são individualmente submetidos a três rodadas de "panning" em fase sólida em hPCSK9 humana diretamente revestida em placas Maxisorp e ainda três de

"panning"s de solução em hPCSK9 biotinilada.

A primeira variante de "panning" é "panning" em fase sólida contra hPCSK9: 2 poços em uma placa Maxisorp (F96 Nunc-Immunoplate) são revestidas com 300 µl de 5 µg/ml de hPCSK9-cada uma *o/n* a 4° C. Os poços revestidos são lavadas 2x com 350 µl de PBS e bloqueadas com 350 µl de MPBS 5% por 2 horas em temperatura ambiente em um agitador de placa de microtitulação. Para cada "panning" cerca de 10¹³ anticorpos de fago HuCAL GOLD são bloqueados com volume igual de PBST/MP 5% por 2 horas em temperatura ambiente. Os poços revestidos são lavadas 2x com 350 µl de PBS após bloqueio. 300 µl de anticorpos de fago HuCAL GOLD® pré-bloqueados são adicionados a cada poço revestido e incubados por 2 horas em temperatura ambiente em um agitador. Lavagem é realizada adicionando cinco vezes 350 µl de PBS/Tween 0,05%, seguido por lavagem mais quatro vezes com PBS. Eluição de fago a partir da placa é realizada com 300 µl de DTT 20 mM em Tris/HCl 10 mM pH 8 por poço por 10 minutos. O eluato de fago DTT é adicionado a 14 ml de TG1 de *E. coli*, que são cultivadas para um OD₆₀₀ de 0,6-0,8 a 37° C em meio 2YT e incubadas em tubos plásticos de 50 ml por 45 minutos a 37° C sem agitação para infecção de fago. Após centrifugação por 10 minutos a 5000 rpm, os péletes bacterianos são cada um ressuspensos em 500 µl de meio 2x YT, postos em placa em placas de ágar 2x YT-CG e incubados da noite para o dia a 30° C. Colônias são então raspadas das placas e os fagos foram resgatados e amplificados conforme acima descrito. As segunda e terceira rodadas do "panning" em fase sólida em hPCSK9 diretamente revestida são realizadas de acordo com o protocolo da primeira rodada, mas com estríngência aumentada no procedimento de lavagem.

A segunda variante de "panning" é "panning" de solução contra hPCSK9 humana biotinilada: para o "panning" de solução, usando hPCSK9 biotinilada acoplada a Dynabeads M-280 (Dyna), o protocolo que segue é aplicado: tubos Eppendorf de 1,5 ml são bloqueados com 1,5 ml de albumina de soro bovino 1% em PBS da noite para o dia a 4° C. 200 µl de Dynabeads M-280 (Dyna) magnéticas revestidas com estreptavidina são lavadas 1x

com 200 µl de PBS e ressuspensas em 200 µl de 1x Chemiblocker (diluído em 1x PBS). Bloqueio de contas é realizado em tubos pré-bloqueados da noite para o dia a 4° C. Fagos diluídos em 500 µl de PBS para cada condição de "panning" são misturados com 500 µl de 2x Chemiblocker / Tween 0,1% 1h em temperatura ambiente (rotator). Pré-adsorção de fagos é realizada duas vezes: 50 µl de contas magnéticas de Estreptavidina bloqueadas são adicionados aos fagos bloqueados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente em um rotator. Após separação de contas com um dispositivo magnético (DynaL MPC-E) o sobrenadante de fago (~1 ml) é transferido para um novo tubo bloqueado e pré-adsorção foi repetida em 50 µl de contas bloqueadas por 30 minutos. Então, hPCSK9 biotinizada 200 mM é adicionada a fagos bloqueados em um novo tubo de 1,5 ml bloqueado e incubada por 1 hora em temperatura ambiente em um rotator. 100 µl de contas magnéticas de estreptavidina bloqueadas são adicionados a cada grupo de fago de "panning" e incubados 10 minutos em temperatura ambiente em um rotator. Fagos ligados à hPCSK9 são imobilizados para as contas magnéticas e coletados com um separador de partícula magnética (DynaL MPC-E). As contas são então lavadas 7x em PBS/Tween 0,05% usando um rotator, seguido por lavagem mais outras três vezes com PBS. Eluição de fago das Dynabeads é realizada adicionando 300 µl de DTT 20 mM em Tris/HCl 10 mM pH 8 a cada tubo por 10 minutos. As Dynabeads são removidas pelo separador de partícula magnética e o sobrenadante é adicionado a 14 ml de uma cultura de TG-1 de *E. coli* cultivada para OD_{600nm} de 0,6-0,8. As contas são então lavadas uma vez com 200 µl de PBS e junto com fagos adicionalmente removidos o PBS foi adicionado aos 14 ml de cultura de TG-1 de *E. coli*. Para infecção de fago, a cultura é incubada em tubos plásticos de 50 ml por 45 minutos a 37° C sem agitação. Após centrifugação por 10 minutos a 5000 rpm, os péletes bacterianos são suspensos, cada um, em 500 µl de meio 2x YT, postos em placa em placas de ágar 2x YT-CG e incubados da noite para o dia a 30° C. As colônias são raspadas das placas e os fagos são resgatados e amplificados conforme acima descrito.

As segunda e terceira rodadas do "panning" de solução em

hPCSK9 biotinizada são realizadas de acordo com o protocolo da primeira rodada, exceto com estringência aumentada no procedimento de lavagem.

Subclonagem e expressão de fragmentos Fab solúveis

Os insertos codificando Fab dos fagemídeos de HuCAL GOLD[®] selecionados são subclonados no vetor de expressão pMORPH[®]X9_Fab_FH para facilitar expressão rápida e eficiente de Fabs solúveis. Para este propósito, o DNA de plasmídeo dos clones selecionados é digerido com XbaI e EcoRI, deste modo excisando o inserto codificando Fab (ompA-VLCL e phoA-Fd) e clonado no vetor de expressão digerido com XbaI/EcoRI pMORPH[®]X9_Fab_FH. Fabs expressos a partir deste vetor carregam dois marcadores C-terminais (FLAG[®] e 6xHis, respectivamente) para ambos, detecção e purificação.

Microexpressão de anticorpos Fab de HuCAL GOLD[®] em E. coli

Colônias simples resistentes a cloranfenicol obtidas após subclonagem dos Fabs selecionados no vetor de expressão pMORPH[®]X9_Fab_FH são usadas para inocular os poços de uma placa de microtitulação de 96 poços estéril contendo 100 µl de meio 2xYT-CG por poço e cultivadas da noite para o dia a 37° C. 5 µl de cada cultura de TG-1 de *E. coli* são transferidos para uma placa de microtitulação de 96 poços estéril, fresca, preenchida com 100 µl de meio 2x YT suplementado com 34 µg/ml de cloranfenicol e glicose 0,1% por poço. As placas de microtitulação são incubadas a 30° C agitando a 400 rpm em um agitador de microplaca até que as culturas estejam levemente turvas (~2-4 horas) com um OD_{600nm} de ~0,5.

Para essas placas de expressão, 20 µl de meio x2 YT suplementado com 34 µg/ml de cloranfenicol e IPTG 3 mM (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) são adicionados por poço (concentração final IPTG 0,5 mM), as placas de microtitulação são vedadas com uma fita permeável a gás e as placas são incubadas da noite para o dia a 30° C agitando a 400 rpm.

Geração de lisatos de célula integral (extratos BEL): Péletes de células bacterianas foram congelados em gelo seco e então ressuspensos em PBS contendo 1 mg/ml de lisozima, MgCl₂ 2 mM e benzonase e incuba-

dos por 1 hora em agitador. Os lisatos foram bloqueados através da adição de BSA em concentração final de 1% e lisatos limpos foram adicionados a placas ELISA apropriadamente revestidas para avaliar a ligação à PCSK9. Os extratos BEL foram usados para análise de ligação através de ELISA.

5 *Técnicas de Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima (ELISA)*

5 µg/ml de hPCSK9 recombinante humana em PBS são revestidos em placas Maxisorp de 384 poços (Nunc-Immunoplate) *o/n* a 4° C. Após revestimento, os poços são lavadas uma vez com PBS / Tween 0,05% (PBS-T) e 2x com PBS. Então os poços são bloqueados com PBS-T com BSA 2% por 2 horas em temperatura ambiente. Em paralelo, 15 µl de extrato BEL e 15 µl de PBS-T com BSA 2% são incubados por 2 horas em temperatura ambiente. As placas Maxisorp bloqueadas são lavadas 3x com PBS-T antes de 10 µl dos extratos BEL bloqueados serem adicionados aos poços e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. Para detecção dos anticorpos Fab primários, os anticorpos secundários que seguem são aplicados: fragmento F(ab')₂ AffiniPure conjugado à fosfatase alcalina (AP), IgG anti-humano, -anti-camundongo ou anti-ovelha de cabra (Jackson Immuno Research). Para a detecção de conjugados AP substratos fluorogênicos tal como AttoPhos (Roche) são usados de acordo com as instruções do fabricante. Entre todas as etapas de incubação, as poços da placa de microtitulação são lavadas com PBS-T três vezes e três vezes após a incubação final com anticorpo secundário. Fluorescência pode ser medida usando leitura de placa Thermo Multiskan.

10
15
20

25 *Expressão de anticorpos Fab de HuCAL GOLD® em E. coli e purificação*

Expressão de fragmentos Fab codificados por pMOR-PH[®]X9_Fab-FH em células TG-1 é realizada em culturas de frasco de agitador usando 750 ml de meio 2x YT suplementado com 34 µg/ml de cloranfenicol. As culturas são agitadas a 30° C até que o OD_{600nm} atinja 0,5. Expressão é induzida através da adição de IPTG 0,75 mM por 20 horas a 30° C. As células são rompidas usando lisozima e fragmentos Fab isolados através de cromatografia Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Alemanha). Concentrações de prote-

30

ina podem ser determinadas através de espectrometria UV (Krebs e outros, *J. Immunol. Methods* 254, 67-84 (2001)).

Exemplo 2: Maturação por afinidade de Fabs anti-PCSK9 selecionados através de troca paralela de cassetes LCDR3 e HCDR2

5 *Geração de bibliotecas de Fab para maturação por afinidade*

A fim de aumentar a afinidade e atividade inibidora dos anticorpos anti-PCSK9 identificados, clones de Fab são submetidos à maturação por afinidade. Para este propósito, regiões CDR são otimizadas por mutagênese de cassete usando mutagênese direcionada a trinucleotídeo (Virnekas e outros, *Nucleic Acids Res* 22, 5600-5607, 1994).

10 O parágrafo que segue descreve rapidamente um protocolo que pode ser usado para clonagem das bibliotecas de maturação e otimização de Fab. Fragmentos Fab do vetor de expressão pMORPH[®]X9_Fab_FH são clonados no vetor de fagemideo pMORPH[®]25 (Patente U.S. No. 6.753.136).
15 Duas estratégias diferentes são aplicadas em paralelo para otimizar ambas, a afinidade e a eficácia dos Fabs de origem.

Bibliotecas de Fab de anticorpo de fago são geradas onde a LCDR3 de seis candidatos de maturação selecionados (clones "de origem") é substituída por um repertório de sequências de CDR3 de cadeia leve individuais. Em paralelo, a região HCDR2 de cada clone de origem é substituída por um repertório de sequências de CDR2 de cadeia pesada individuais. Bibliotecas de maturação de afinidade são geradas através de procedimentos de clonagem padrão e transformação dos clones diversificados em células TOP10F' de *E. coli* eletrocompetentes (Invitrogen). Fagos apresentando Fab são preparados conforme descrito no Exemplo 1. Grupos de maturação correspondendo a cada biblioteca são formados e mantidos separados durante o processo de seleção subsequente.

Estratégias de "panning" de maturação

20 "Panning"s usando os quatro grupos de anticorpo são realizados
30 em hPCSK9 recombinante biotinizada em solução para três rodadas, respectivamente conforme descrito no Exemplo 1, "panning" de solução contra hPCSK9 biotinizada. A estringência de seleção é aumentada através da re-

dução de antígeno biotinizado de rodada de "panning" para rodada de "panning", através de etapas de lavagem prolongadas e através da adição de antígeno não-biotinizado para dissociação (*off-rate selection*).

5 *Análise de ligação baseada em eletroquimioluminescência (BioVeris) para detecção de Fab se ligando à hPCSK9 em lisatos de bactérias*

Ligação de anticorpos Fab otimizados em lisatos de *E. coli* (extratos BEL) à hPCSK9 é analisada em BioVeris M-SERIES® 384 Analyzer BioVeris, Europa, Witney, Oxfordshire, UK). Extratos BEL são diluídos em tampão de ensaio (PBS/Tween 20 0,05%/BSA 0,5%) para uso em avaliação de BioVeris. hPCSK9 biotinizada é acoplada a contas paramagnéticas revestidas com estreptavidina, (Fab)₂ anti-humano (Dianova) foi rotulado com rútenio usando o BV-tag® (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK). Este anticorpo secundário é adicionado às contas acopladas à hPCSK9 antes da medição no BioVeris M-SERIES® 384 Analyzer. Análise de sequência desses pedaços da avaliação de BioVeris é conduzida para identificar clones de Fab. Anticorpos Fab selecionados são subclonados em formato IgG1.

15 *Determinação de afinidades picomolares usando Titulação de Equilíbrio de Solução (SET)*

Para determinação de K_D , frações de monômero (teor de monômero de pelo menos 90%, analisado através de SEC analítica; Superdex75, Amersham Pharmacia) de Fab são usadas. Determinação de afinidade baseada em eletroquimioluminescência (ECL) em solução e avaliação de dados podem ser realizadas essencialmente conforme descrito por Haenel e outros, 2005. Uma quantidade constante de Fab é equilibrada com concentrações diferentes (diluições 3^o seriais) de hPCSK9 recombinante em solução. hPCSK9 biotinizada acoplada a contas paramagnéticas (Estreptavidina M-280, Dynal) e (Fab)₂ anti-humano (Dianova) rotulado com BV-tag® (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) são adicionados e a mistura incubada por 30 minutos. Subseqüentemente, a concentração de Fab não-ligado é quantificada através de detecção ECL usando o analisador M-SERIES® 384 (BioVeris Europe).

Determinação de afinidade para PCSK9 de outra espécie (por

exemplo, chimpanzé ou cinomólogo) em solução é feita essencialmente conforme acima descrito, substituindo a PCSK9 humana com PCSK9 de chimpanzé ou cinomólogo. Para detecção do Fab livre, hPCSK9 biotinilada acoplada a contas paramagnéticas é usada. Afinidades são calculadas de acordo com Haenel e outros (2005 *Anal. Biochem.* 339, 182-184).

Exemplo 3. Geração de Fab Anti-PCSK9 através de Exibição de Fago

Fab anti-PCSK9 foi gerado usando as técnicas de exibição de fago que seguem. PCSK9 humana purificada foi rotulada com biotina PEO4 (Pierce, 21329) usando o protocolo do fabricante usando uma razão molar 20:1 de biotina:PCSK9. Razões molares baixas asseguram modificação limitada da proteína sendo rotulada e a escolha do ligante PEO4 separa a porção biotina da proteína e aumenta a hidrofobicidade geral da proteína biotinilada. PCSK9 humana biotinilada foi usada para revestir contas de estreptavidina Dynal M280 e a biblioteca Morphosys Hucal foi "panned" por 3 rodadas usando técnicas de "panning" padrão. Após três rodadas iterativas de "panning", o DNA de plasmídeo das 3 rodadas agrupado foi purificado e digerido com enzimas de restrição EcoRI e XbaI. DNA de plasmídeo foi separado através de eletroforese em gel de agarose e o inserto de 1,5 kB contendo dois segmentos de gene (cadeia pesada de imunoglobulina (VH/CH) e cadeia leve (VL/CL)) foi excisado e purificado. Este fragmento de 1,5 kB (inserto Fab) foi subclonado no vetor de expressão Morphosys pMOR-PHX9_FH e transformado em células TG-1 eletrocompetentes. Colônias individuais foram escolhidas e placas máster foram preparadas. Placas filhas inoculadas das placas máster foram novamente cultivadas em meio com pouca glicose e expressão de Fab foi induzida através de cultura na presença de IPTG da noite para o dia. Péletes de célula foram congelados, lisados com lisozima e lisatos limpos foram avaliados através de ELISA em placas revestidas com PCSK9 biotinilada com PEO revestidas em poços revestidas com neutravidina (controles negativos neutravidina sozinha). ELISA positivos foram testados novamente seguindo a nova realização de listras de placa máster em placas de ágar e seleção de 3 colônias individuais para novo teste. DNA de plasmídeo de clones de PCSK9 foi também preparado para se-

quênciamento de DNA. Proteína Fab de clones únicos foi preparada em culturas de escala em litro induzidas com IPTG e então purificada seqüencialmente por IMAC e cromatografia de exclusão de tamanho. Concentrações de proteína foram determinadas através do ensaio Bradford acoplado com SDS-PAGE.

Exemplo 4: ELISA Competitivo de PCSK9

PCSK9 humana purificada rotulada com NHS-PEO4-biotina (Pierce, 21329) foi usada para revestir placas Nunc Maxisorp revestidas com neutravidina. Seguindo o bloqueio de ligação não-específica com BSA, poços revestidos com PCSK9 foram incubadas primeiro com uma concentração de saturação de Fab PCSK9 anti-humano (Fab controle positivo) ou com tampão sozinho. Seguindo ligação do Fab controle positivo (ou tampão sozinho), Fabs PCSK9 anti-humano alternados (Fab teste) foram adicionados a ambas aos poços tratados com tampão sozinho e Fab PCSK9 anti-humano.

Após etapas de incubação e lavagem, fragmentos de anticorpo ligados a PCSK9 humana ligada à placa foram detectados usando um coquetel de anticorpos de cadeia leve anti-humanos de cabra, conjugados com peroxidase, com substrato de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB). Fabs que competem com sítios de ligação similares ou de sobreposição em PCSK9 humana falham em elicitar sinais de ligação adicionais (isto é, competição de ligação para sítios similares ou de sobreposição em PCSK9 humana) comparado com Fab controle positivo sozinho. Alternativamente, Fabs que se ligam independentemente do Fab controle positivo exibem sinais de ligação aumentados conforme refletido por níveis altos de conversão de substrato TMB (isto é, ligação não-competitiva de Fabs e PCSK9 humana). Usando esta estratégia, Fabs foram agrupados com base na habilidade de membros em bloquear a ligação uns dos outros à PCSK9 humana. Caracterização inicial com H1-anti-PCSK9-Fab como o Fab controle positivo dividiu os anticorpos em dois grupos: inibidos por H1 (grupo 1) ou não-inibidos por H1 (grupo 2).

Experimentos de competição de ligação adicionais demonstraram que Fabs dentro de cada grupo inibiram a ligação de outros membros daquele grupo. A partir desses estudos, um terceiro grupo de Fabs (grupo 3) foi identificado

em virtude de não-competição com Fabs ou do grupo 1 ou grupo 2. Agrupamento de Fab foi utilizado como um guia para determinar quais dos Fabs anti-PCSK9 caracterizar para afinidade de ligação, habilidade em romper o hPCSK9/LDL-R e os efeitos sobre células HepG2. O sítio de ligação preciso em PCSK9 humana de Fabs com propriedades desejadas *in vitro*, tal como H1, foram então mapeadas usando técnicas biofísicas tal como DXMS, conforme ilustrado no Exemplo 4.

Exemplo 5: Análise Funcional de Fab Anti-PCSK9

Neste exemplo, as propriedades funcionais do Fab H1-anti-PCSK9 foram examinadas, incluindo afinidade de ligação, habilidade em romper o hPCSK9/LDL-R e os efeitos sobre células HepG2.

1. Afinidade de Ligação

Ensaios de ligação Biacore foram realizados a 25° C em um instrumento T100. HBS-P+Ca (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, P-20 0,005%, CaCl₂ a 2 mM) foi usado como o tampão de ativação. Para imobilização, hPCSK9 foi diluída em acetato pH 5,5 a 30 µg/mL um pouco antes do uso. Cerca de 200 RU de hPCSK9 foram imobilizados em um sensor chip CM5 (Série S) seguindo o protocolo de acoplamento de amina padrão. Soluções de Fab (0-20 nM, diluído no tampão de ativação) foram injetadas na PCSK9 e superfície de referência (acoplamento de amina vazio) em uma taxa de fluxo de 30 µl/min. Superfície de PCSK9 foi regenerada com uma injeção de 60 segundos de NaOH a 1 mM e NaCl a 1M.

Todas as análises de dados foram feitas usando um software BI-Evaluation. Curvas de ligação foram corrigidas com referência dupla, primeiro com a curva de ligação da célula de referência, seguido pela curva de ligação do vazio do tampão de ativação. Então os dados foram analisados globalmente dentro de um modelo 1:1 de ligação para extrair constante de ligação K_D (nM), constante de taxa de associação (k_a , 1/Ms) e dissociação (k_d , 1/s).

Foi determinado que H1-Fab exibia uma k_a de $3,23 \times 10^5$ (1/Ms), k_d de $3,41 \times 10^{-3}$ (1/s) e K_D de $1,05 \times 10^{-8}$ M (Figura 3).

2. Habilidade do Fab H1-Anti-PCSK9 em Romper

hPCSK9/LDL-R

Um ensaio de rompimento FRET de PCSK9-LDL-R foi realizado como segue para avaliar a habilidade de H1-Fab em romper a interação hPCSK9-LDL-R. O domínio extracelular de LDL-R (Ala 22-Arg 788) (R&D System) foi rotulado com criptato de *europium* (LDL-R-Eu) (Perkin Elmer) e proteína purificada de PCSK9 foi rotulada com Alexa Fluor 647 (PCSK9-Alexa) (Invitrogen). O tampão de ensaio consistia em HEPES a 20 mM (pH 7,0), NaCl a 150 mM, CaCl₂ a 2 mM, Tween 20 0,1% e BSA 1 mg/ml. O Fab foi pré-incubado com PCSK9-Alexa em temperatura ambiente por 30 minutos antes de LDL-R-Eu ser adicionada. A concentração final de PCSK9-Alexa e LDL-R-Eu era 8 nM e 1 nM, respectivamente. Após duas horas de incubação, a placa foi lida em Envision (Perkin Elmer) com os ajustes que seguem: excitação a 330 nm e emissões em cerca de 620 nm e 665 nm, 100 µS de retardo entre a excitação e as leituras. A razão de leitura a 665 nm sobre leitura a 620 nm é normalizada e relatada na Figura 4.

Conforme mostrado na Figura 4A, H1-Fab rompeu a interação hPCSK9/LDL-R.

3. Efeito sobre células HepG2

Absorção de LDL foi medida usando citometria de fluxo. Células HepG2 (ATCC) foram mantidas em DMEM com soro bovino fetal (FBS) 10% (V/V). As células foram semeadas em uma placa de 96 poços revestida com colágeno em 96 poços (BD Bioscience), na noite anterior a tratamento Ab de PCSK9. 200 nM de proteína PCSK9 foram pré-incubados com Fab anti-PCSK9 em concentrações indicadas por 30 minutos antes da adição a células.

Após tratamento de PCSK9 e Fab por 3 horas, di-LDL (Intracel) foi adicionada diretamente a cada poço para uma concentração final de 5 µg/ml e incubada por uma hora adicional a 37° C, CO₂ 5%. As células foram tripnizadas, coletadas e células positivas para di-LDL foram medidas através de citometria de fluxo (LSRII, BD Bioscience). Médias geométricas foram analisadas usando *software* FlowJo 5.7.2, normalizadas para controle de tampão, e relatadas na Figura 4.

LDL na superfície foi também medida usando citometria de fluxo (Figura 4B). Células HepG2 foram tripnizadas, semeadas em placa revestida com colágeno e incubadas da noite para o dia a 37° C com CO₂ 5% para permitir a recuperação de expressão de LDL-R. No dia seguinte, proteína PCSK9 e Fab PCSK9 foram pré-misturados 30 minutos antes da incubação com células por 4 horas. As células foram coletadas com Versene (Invitrogen) e bloqueadas com soro de burro (Jackson Immunoresearch Laboratories) antes do tingimento com um anticorpo policlonal LDL-R anti-Humano de coelho (Fitzgerald) e subseqüentemente com anticorpo IgG anticoelho de burro conjugado com APC (Jackson Immunoresearch Laboratories). Após lavagem, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% e submetidas à análise de citometria de fluxo em um citômetro BD LSR-II. As médias de médias geométricas foram calculadas usando *software* FlowJo 5.7.2 e relatadas na Figura 4.

Conforme mostrado na Figura, H1-Fab levou a níveis de LDL-R na superfície aumentados (Figura 4B) e absorção de LDL aumentada pelas células Hep2 (Figura 4C).

Exemplo 6: Mapeamento de Epitopo

Neste exemplo, espectrometria de massa de troca de deutério (DXMS) foi usada para determinar o(s) epitopo(s) reconhecidos por H1-Fab como segue.

A. Materiais

Diluyente de proteína (H₂O ou D₂O) era fosfato de sódio a 20 mM, pH 7,3 com NaCl a 150 mM. A solução de extinção foi ácido trifluoroacético 0,5% (v/v) (TFA) em água. Todos outros agentes químicos foram comprados da Sigma e solventes de grau HPLC eram da Fisher Scientific. Incubações de Proteína:Fab foram preparadas e deixadas incubar por pelo menos 2 horas a 4° C.

B. Troca de Hidrogênio/Deutério (H/D) em Solução

Experimentos de espectrometria de massa de troca de H/D automatizados foram realizados com um ajuste similar e maneira similar conforme descrito na literatura (*Anal. Chem.* 2006, 78, 1005-1014). Em suma,

uma distribuidor de líquido LEAP Technologies Pal HTS (LEAP Technologies, Carrboro, NC) foi usado para todas as operações de distribuição de líquido. O distribuidor de líquido foi controlado através de instruções de automação escritas em LEAP Shell que foram codificadas pelo fabricante. O robô foi alojado em um espaço fechado refrigerado mantido a 2° C. Placas para amostra, diluente e solução de extinção foram carregados nas bandejas de distribuidor de líquido antes do início de uma sequência experimental. Uma válvula de injeção de 6 portas e uma estação de lavagem foram também montadas no trilho do distribuidor de líquido e facilitam injeção de amostra no sistema cromatográfico e lavagem de seringa, respectivamente. O sistema cromatográfico consistia em duas válvulas adicionais, uma coluna de enzima, um cartucho de aprisionamento de fase reversa e uma coluna analítica foi alojada em uma câmara separada construída em casa e mantida a 2° C por pilhas peltier. As conexões de fluido e ajuste do cartucho de aprisionamento de fase reversa, de pepsina imobilizada, e coluna analítica para as válvulas são ilustradas na Figura 5. Válvulas e colunas foram configuradas de modo a permitir digestão de proteína em linha, dessalinização de peptídeo e cromatografia de fase reversa antes da introdução da amostra na fonte de ionização por eletropulverização (ESI) do espectrômetro de massa. As correntes de fluido requeridas para operação foram providas por dois sistemas de HPLC Agilent separados (Agilent 1100, Palo Alto, CA). A primeira bomba de HPLC (bomba de carregamento) liberou ácido trifluoroacético (TFA) 0,05% (v/v) em água a 125 µL/min. As posições da válvula durante a fase de carregamento são ilustradas na Figura 5A. Nesta fase a amostra é transferida da alça de amostra através do cartucho de pepsina imobilizada (2 mm x 20 mm, gentilmente provido pelo Prof. Virgil Woods de UCSD) para um cartucho de aprisionamento de fase reversa (1 mm x 8 mm, Michrom Bioresources Inc., Auburn, CA). Subseqüentemente, válvula auxiliar 2 foi mudada de modo que a segunda bomba de HPLC (bomba de gradiente) liberou um gradiente através do cartucho de aprisionamento de fase reversa e a coluna analítica na válvula auxiliar 3. O cartucho de enzima imobilizado foi isolado para refugio nesta posição. A válvula auxiliar 3 foi programada para

desviar fluxo para refugio por um período de tempo predeterminado para dessalinização (Figura 5B) da amostra carregada no cartucho de aprisionamento. Após o período de dessalinização, a válvula foi mudada de modo a permitir que o fluxo da bomba de gradiente atingisse a fonte de íon do espectrômetro de massa (após passagem pelo cartucho de aprisionamento e pela coluna analítica, Figura 5C). A bomba de gradiente liberou um gradiente de 0 a 40% de fase móvel B durante 55 minutos a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ (fase móvel A=ácido fórmico 0,2% em água, B=ácido fórmico 0,2% em acetonitrila).

C. Espectrometria de Massa

Espectrometria de Massa em Tandem com Ionização por Eletropulverização de Cromatografia Líquida (LC-ESI-MS) foi realizada em um QToF Ultima Global (Waters, Milford, MA) operado em modo V. Dois experimentos de mudança MS/MS dependentes de dados foram realizados para coletar espectros de massa em tandem para o propósito de identificação das sequências dos peptídeos geradas através de proteólise *on-line*. Aquisições realizadas para o propósito de determinação do nível de deuteração foram apenas MS (varreduras de 5 s em m/z 400-1500).

D. Experimentos de Troca de Hidrogênio/Deutério (H/D) Complementares

A proteína (hPCSK9 e seu pró-domínio PD) foi submetida a várias condições de troca *ativada e desativada (on-and off-exchange)* com o resultado líquido esperado sendo uma rotulação de qualquer epitopo potencial através de um aumento nos níveis de deuteração com relação ao controle no experimento de proteção (descrito abaixo) e uma redução em nível de deuteração com relação ao controle no experimento In- D_2O (descrito abaixo).

Deuteração, que é a troca de hidrogênios de amida na proteína com deutério, é uma ferramenta especialmente útil para o teste de estrutura e funcionamento de proteínas porque rotulação com deutério não muda a estrutura ou funcionamento da proteína rotulada. O deutério é um isótopo de hidrogênio que tem duas vezes a massa do hidrogênio, indicado na Figura 6 por estrelas. Isto está em contraste total com outros métodos de rotulação

que ligam porções novas a grupos funcionais existentes em proteínas.

1. Experimento de Proteção

No experimento de proteção, solução de proteção deuterada foi preparada através da incubação da noite para o dia da proteína em fosfato de sódio 20 mM, pH 7,3 com NaCl a 150 mM em D₂O. No experimento controle, proteínas deuteradas foram diluídas com H₂O e após períodos de tempo variáveis de troca *off* (por exemplo, 5 minutos) solução extinta foi adicionada. Isto foi seguido por digestão *on-line* com pepsina e LCMS conforme acima descrito. Troca *off* do complexo proteína:Fab foi realizada através de diluição da solução de proteína deuterada com uma quantidade equimolar de solução Fab (não-deuterada, vide Figura esquemática 6, coluna à direita) e incubação por 15 minutos para formar o complexo proteína (deuterada):Fab. Após formação do complexo a mostra foi tratada conforme descrito abaixo para o controle.

A coluna à esquerda da Figura 6 ilustra a sequência experimental para o experimento de proteção, que começa com PCSK9 deuterada. "Deuterado" significa que os hidrogênios amida da proteína foram substituídos com deutério através da incubação da proteína em tampão de deutério por um período de várias horas. Conforme ilustrado na segunda fileira na coluna à esquerda da Figura 6, a ligação do Fab a seu epitopo na proteína PCSK9 deuterada vai bloquear parte da superfície de PCSK9 em torno da área do epitopo. O bloqueio da superfície também reduz acesso a solvente, que é crítico para troca de hidrogênio/deutério acontecer. Na terceira fileira na coluna à esquerda da Figura 6 o efeito de incubação de complexo PCSK9/Fab deuterado em tampão não-deuterado é ilustrado.

Conforme mostrado na Figura 6, níveis de deuteração sobre PCSK9 são rapidamente reduzidos nas áreas acessíveis a solvente porque troca de H/D pode acontecer livremente. Em contraste, o acesso de solvente reduzido à área do epitopo devido à ação de bloqueio do Fab que converte a superfície faz com que a troca H/D seja deixada mais lenta. Isto resulta na preservação da maior parte da deuteração na área do epitopo.

É possível localizar os níveis aumentados de deuteração (mar-

cando o epitopo) ao longo da sequência de proteína ao cortar o complexo proteína Fab em pedaços menores com uma enzima e medição do nível de deuteração de cada um dos fragmentos com um espectrômetro de massa. Isto é possível porque a mudança de massa que acontece resulta de deuteração uma vez que o deutério é mais pesado do que o hidrogênio. Reunião da informação coletada dos fragmentos permite que uma pessoa derive a distribuição de deutério em toda a sequência da proteína.

2. Controle

Devido ao fato dos níveis de deutério variarem muito em toda a sequência de proteína devido à estrutura da proteína e a variação resultante em acessibilidade de solvente bem como a diferenças em taxas de troca H/D observadas para ligações amida formadas entre aminoácidos diferentes, é impossível concluir apenas a partir de um nível de deuteração elevado observado no experimento de proteção (descrito pela coluna à esquerda da Figura 6) sobre a presença de um epitopo. Felizmente, a variação natural de níveis de deuteração cancela em um experimento diferente. O experimento diferencial consiste na medição dos níveis de deuteração na presença e na ausência (experimento controle, coluna do centro da Figura 6) do Fab e cálculo da diferença em deuteração. As diferenças observadas em nível de deuteração são atribuíveis apenas aos efeitos do Fab e valores altos serão indicativos da presença e localização de epitopos.

3. Experimento In-D₂O

Ainda, experimento diferencial complementar (isto é, um experimento in-D₂O) ilustrado na coluna à direita da Figura 6 pode ser realizado e o resultado esperado deduzido usando lógica similar àquela proposta para o experimento da coluna à esquerda. A diferença principal sendo que a diferença observada em deuteração para o experimento da coluna à direita deve ser oposta em sinal àquela da coluna à esquerda e provê então evidência complementar quanto à presença e localização de um epitopo potencial bem como validação de resultados uns contra os outros.

Em um experimento In-D₂O típico (vide Figura 6 esquemática, colunas do meio e à direita) proteína (controle) ou alternativamente complexo

proteína:Fab é diluído em tampão de D₂O. Após um período fixo de troca on a mistura é diluída mais com tampão de H₂O para causar troca off e finalmente extinta com tampão de extinção. Uma vez misturada, a solução extinta é totalmente automaticamente proteolisada, separada e analisada através de LCMS conforme acima descrito. Vários períodos de incubação de D₂O (por exemplo, 45s) foram usados no experimento para otimizar as diferenças observadas em deuteração entre controle (proteína apenas) e a amostra de proteína:Fab. A mudança média em deuteração entre amostra e controle foi calculada como a diferença entre os níveis de absorção de deutério da amostra e controle, onde níveis de absorção de deutério foram determinados conforme descrito abaixo sob processamento de dados.

E. *Processamento de Dados*

Aquisições MS em tandem foram reduzidas para listas de pico usando MassLynx (Waters, Milford, MA) e pesquisadas contra a sequência de proteína usando Mascot (Matrix Sciences, Londres, UK). Uma lista de identificações de sequência de peptídeo prováveis retornada através da pesquisa ao banco de dados foi manualmente validada. MassLynx foi usado para gerar cromatogramas de íon único das massas de íon de precursoras validadas. Espectros de massa das distribuições isotópicas de cada precursor foram somados através do pico cromatográfico, estabilizados e centrados de modo a determinar o nível de absorção de deutério. Para designar um nível de absorção de deutério para cada resíduo da sequência de proteína o procedimento abaixo foi seguido. Os resíduos foram indicados com a absorção de deutério normalizada dos peptídeos que os cobriam. Se mais de um peptídeo cobrisse o mesmo resíduo a média da absorção de deutério normalizada de todos os peptídeos cobrindo este resíduo seria usada. A absorção de deutério normalizada para cada peptídeo foi calculada dividindo o nível de deuteração observado pelo número de aminoácidos neste peptídeo.

F. *Resultados*

A mudança média observada em deuteração para os experimentos de proteção e In-D₂O realizados em hPCSK9 e complexo hPCSK9:H1-Fab como uma função de número de resíduo de hPCSK9 (pró-domínio inclu-

ido, domínio rico em cisteína é excluído uma vez que ele não foi coberto pelos experimentos) é mostrada na Figura 7. As sequências de aminoácido das regiões mostrando o comportamento esperado de um epitopo potencial são também mostradas na Figura 7.

5 A Figura 7A mostra a mudança em deuteração para o experimento de proteção. A mudança em deuteração é definida como a diferença entre o nível de deuteração do experimento ilustrado na Figura 6 (Figura à esquerda, com Fab presente) e seu controle (coluna do meio, sem Fab). A mudança em deuteração é posta em gráfico como a mudança de massa média por resíduo sobre o número de resíduo de resíduos de aminoácido 40 a 420
10 da sequência PCSK9 (começando com o pró-domínio e excluindo o domínio rico em cisteína). Um valor alto para a mudança em deuteração (indicado como uma mudança de massa positiva por resíduo) é indicativo de um epitopo. A região de resíduos 123-132 (sequência explicada em gráficos) sobressai com relação a isso e é então considerada cobrir todo ou parte de um
15 epitopo.

Os dados complementares do experimento In-D₂O (ilustrado na coluna à direita na Figura 6) são postos em gráfico na Figura 7A. Comparação dos dois gráficos mostrados na Figura 7 revela que a extensão de aminoácidos 123-132 LVKMSGDLLE mostra a mudança antecipada de níveis
20 de deuteração para um epitopo conforme esperado da elaboração experimental (Figura 6). A região 123-132 (LVKMSGDLLE) na estrutura em cristal de PCSK9 (vide Figura 8) cobre parte de uma hélice e alça e faz sentido físico como um epitopo potencial uma vez que ela é altamente acessível.

25 Não imediatamente óbvios a partir dos dados mostrados na Figura 7 são resíduos de extensão 101-107 da segunda região (QAARRGY) (vide Figura 8), que é uma subseção de uma região maior que também mostra o comportamento de complementaridade esperado em níveis de deuteração na Figura 7 que seria característico de um epitopo potencial. O método usado para mapeamento para trás (*mapping back*) da mudança em nível de
30 deuteração da deuteração dos peptídeos observados na sequência primária tem um efeito fortemente estabilizante, o que é desejável uma vez que as

flutuações observadas na medição são bem grandes.

Por outro lado, esta deslocalização de níveis de deutério torna mais difícil detectar a participação provável da região coberta pelos resíduos 101-107 no epitopo a partir dos dados como é posto em gráfico na Figura 7.

5 Ainda, inspeção detalhada dos peptídeos observados cobrir a região maior permite que a maior parte da troca seja atribuída à região muito curta 101-107.

10 Ainda, é importante notar na estrutura em cristal que esta região mais curta está espacialmente localizada à direita próximo à região 123-132, o que sugere que ambas as extensões formam o epitopo não-linear de H1-Fab em hPCSK9. Importante, as duas extensões de aminoácidos implicadas pelos dados da Figura 7 formam um epitopo não-linear para H1-Fab, o que se relaciona com as sequências de aminoácido SEQ ID NOs: 2 e 3 previstas para epitopos antigênicos de hPCSK9 (Tabela 2).

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ligação ao polipeptídeo da pró-proteína converta-se subtilisina /quexina tipo 9 (PCSK9) isolada compreendendo uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo que se liga especificamente a uma
5 PCSK9, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro do domínio catalítico de PCSK9 humana (SEQ ID NO:1) dentro ou sobrepondo a um dos que seguem:

(a) aminoácidos 166 a 177 da SEQ ID NO:1;

(b) aminoácidos 187 a 202 da SEQ ID NO:1;

10 (c) aminoácidos 206 a 219 da SEQ ID NO:1;

(d) aminoácidos 231 a 246 da SEQ ID NO:1;

(e) aminoácidos 277 a 283 da SEQ ID NO:1;

(f) aminoácidos 336 a 349 da SEQ ID NO:1;

(g) aminoácidos 368 a 383 da SEQ ID NO:1; ou

15 (h) aminoácidos 426 a 439 da SEQ ID NO:1.

2. Molécula de ligação à PCSK9 isolada compreendendo uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo que se liga especificamente a uma PCSK9, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro do domínio rico em cisteína de PCSK9 humana dentro ou sobrepondo
20 a um dos que seguem:

(a) aminoácidos 443 a 500 da SEQ ID NO: 1;

(b) aminoácidos 557 a 590 da SEQ ID NO: 1; ou

(c) aminoácidos 636 a 678 da SEQ ID NO: 1.

3. Molécula de ligação à PCSK9 isolada compreendendo uma
25 porção de ligação de antígeno de um anticorpo que se liga especificamente a uma PCSK9, onde a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro do pró-domínio de PCSK9 humana ou sobrepondo aos aminoácidos 89-134 da SEQ ID NO:1.

4. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma
30 das reivindicações 1 a 3, em que a porção de ligação de antígeno é reativa cruzada com uma PCSK9 de um primata não-humano.

5. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma

das reivindicações 1 a 3, em que a porção de ligação de antígeno é reativa cruzada com uma PCSK9 de uma espécie de roedor.

5 6. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo linear.

7. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear.

10 8. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 7, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear consistindo em pelo menos uma porção de cada um dos epitopos lineares que seguem:

(a) aminoácidos 89-101 da SEQ ID NO:1; e

(b) aminoácidos 106-134 da SEQ ID NO:1.

15 9. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 7, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear consistindo em pelo menos uma porção de cada um dos epitopos lineares que seguem:

(a) aminoácidos 166-177 da SEQ ID NO:1; e

20 (b) aminoácidos 443-458 da SEQ ID NO:1.

10. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 7, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear consistindo em pelo menos uma porção de dois ou três epitopos lineares que seguem:

25 (a) aminoácidos 187-202 da SEQ ID NO:1;

(b) aminoácidos 231-246 da SEQ ID NO:1; e

(c) aminoácidos 368-383 da SEQ ID NO:1.

30 11. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 7, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear consistindo em pelo menos uma porção de cada um dos epitopos lineares que seguem:

(a) aminoácidos 206-219 da SEQ ID NO:1; e

(b) aminoácidos 277-283 da SEQ ID NO:1.

12. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 7, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear consistindo em pelo menos uma porção de cada um dos epitopos lineares que seguem:

(a) aminoácidos 336-349 da SEQ ID NO:1; e

(b) aminoácidos 426-439 da SEQ ID NO:1.

13. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 7, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear consistindo em pelo menos uma porção de cada um dos três epitopos lineares que seguem:

(a) aminoácidos 459-476 da SEQ ID NO:1;

(b) aminoácidos 486-500 da SEQ ID NO:1; e

(c) aminoácidos 557-573 da SEQ ID NO:1.

14. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 7, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear consistindo em pelo menos uma porção de dois ou três dos epitopos lineares que seguem:

(a) aminoácidos 577-590 da SEQ ID NO:1;

(b) aminoácidos 636-645 da SEQ ID NO:1; e

(c) aminoácidos 659-677 da SEQ ID NO:1.

15. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 2, em que a porção de ligação de antígeno se liga especificamente a um epitopo de PCSK9 humana dentro ou sobrepondo dentro ou sobrepondo a um dos que seguem:

(a) aminoácidos 443-458 da SEQ ID NO:1;

(b) aminoácidos 459-476 da SEQ ID NO:1;

(c) aminoácidos 486-500 da SEQ ID NO:1;

(d) aminoácidos 557-573 da SEQ ID NO:1;

(e) aminoácidos 577-590 da SEQ ID NO:1;

(f) aminoácidos 636-645 da SEQ ID NO:1; ou

(g) aminoácidos 659-677 da SEQ ID NO:1.

16. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 3, em que a porção de ligação de antígeno se liga especificamente a um epítopo de PCSK9 humana dentro ou sobrepondo a um dos que seguem:

(a) aminoácidos 89-101 da SEQ ID NO:1; ou

(b) aminoácidos 106-134 da SEQ ID NO:1.

17. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, em que a porção de ligação de antígeno se liga à PCSK9 com uma constante de dissociação (K_D) igual a ou menor do que 10 nM.

18. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que a porção de ligação de antígeno se liga à PCSK9 com uma constante de dissociação (K_D) igual a ou menor do que 1 nM.

19. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 18, em que a porção de ligação de antígeno se liga à PCSK9 com uma K_D igual a ou menor do que 0,5 nM.

20. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 19, em que a porção de ligação de antígeno se liga à PCSK9 com uma K_D igual a ou menor do que 0,1 nM.

21. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 18, em que a porção de ligação de antígeno se liga à PCSK9 de um primata não-humano com uma K_D igual a ou menor do que 0,3 nM.

22. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 18, em que a porção de ligação de antígeno da mesma se liga à PCSK9 com uma K_D igual a ou menor do que 0,5 nM.

23. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, em que a porção de ligação de antígeno é uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo humano.

24. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 23, em que o anticorpo é um anticorpo humanizado ou humanizado.

25. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, em que a porção de ligação de antígeno é uma

porção de ligação de antígeno de um anticorpo monoclonal.

26. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 23, em que a porção de ligação de antígeno é uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo policlonal.

5 27. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-26, em que a molécula de ligação à PCSK9 é um anticorpo quimérico.

10 28. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-26, em que a molécula de ligação à PCSK9 compreende um fragmento Fab, um fragmento Fab', um F(ab')₂ ou fragmento Fb do anticorpo.

29. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-26, em que a molécula de ligação à PCSK9 compreende um Fv de cadeia simples.

15 30. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-26, em que a molécula de ligação à PCSK9 compreende um diacorpo.

20 31. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, em que a porção de ligação de antígeno é derivada de um anticorpo de um dos isotipos que seguem: IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.

32. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, em que a molécula de ligação à PCSK9 inibe ligação de PCSK9 a um ligante de PCSK9.

25 33. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, em que a molécula de ligação à PCSK9 inibe ligação de PCSK9 a um receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-R).

30 34. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, em que a molécula de ligação à PCSK9 inibe atividade proteolítica de PCSK9.

35. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 34, em que a molécula de ligação à PCSK9 inibe proteólise do pró-domínio

de PCSK9.

36. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, em que a molécula de ligação à PCSK9 inibe a diminuição dependente de PCSK9 de LDL-R em um hepatócito.

5 37. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 36, em que a molécula de ligação à PCSK9 inibe degradação dependente de PCSK9 de LDL-R em hepatócitos.

10 38. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, em que a molécula de ligação à PCSK9, quando contatada com um hepatócito sob condições em que PCSK9 está presente, aumenta a absorção de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) pelo hepatócito, com relação à absorção de LDL-c pelo hepatócito na ausência da molécula de ligação à PCSK9.

15 39. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 38, em que a molécula de ligação à PCSK9 se liga à PCSK9 na presença de LDL-c.

40. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, em que a molécula de ligação à PCSK9 se liga à PCSK9 na presença de soro.

20 41. Molécula de ligação à PCSK9 compreendendo um domínio de ligação à PCSK9, em que a sequência de aminoácido do domínio de ligação à PCSK9 é pelo menos 75% idêntica a uma sequência de aminoácido de uma dobra tipo imunoglobulina de uma fibronectina, um receptor de citocina ou uma caderina, e em que a sequência de aminoácido do domínio de ligação à PCSK9 é alterada, com relação à sequência de aminoácido da dobra tipo imunoglobulina, de modo que o domínio de ligação à PCSK9 se liga
25 especificamente à PCSK9.

42. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 41, em que o domínio de ligação à PCSK9 se liga à PCSK9 com uma K_D
30 igual a ou menor do que 10 nM.

43. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 41, em que o domínio de ligação à PCSK9 se liga à PCSK9 com uma K_D

igual a ou menor do que 1 nM.

44. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 41, em que a dobra tipo Ig é uma dobra tipo Ig de uma fibronectina.

45. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 44, em que a dobra tipo IgG é uma dobra tipo IgG de fibronectina tipo III.

46. Composição farmacêutica compreendendo a molécula de ligação à PCSK9 como definida em qualquer uma das reivindicações 1-45.

47. Método de aumento dos níveis de LDL-R em um hepatócito, o método compreendendo contato do hepatócito com uma molécula de ligação à PCSK9.

48. Método de aumento da absorção de LDL-c por um hepatócito, o método compreendendo contato do hepatócito com uma molécula de ligação à PCSK9, deste modo reduzindo a sub-regulagem de LDL-R por PCSK9 e aumentando a absorção de LDL-c pelo hepatócito.

49. Peptídeo consistindo em uma sequência de aminoácido pelo menos 90% idêntica a uma das sequências de aminoácido que seguem:

YRADEYQPPDGG (SEQ ID NO:4);

TSIQSDHREIEGRVMV (SEQ ID NO:5);

ENVPEEDGTRFHRQ (SEQ ID NO:6);

AGVVSGRDAGVAKGAS (SEQ ID NO:7);

VQPVGPL (SEQ ID NO:8);

VGATNAQDQPVTLG (SEQ ID NO:9);

IIGASSDCSTCFVSQS (SEQ ID NO:10);

EAWFPEDQRVLTPN (SEQ ID NO:11);

ALPPSTHGAGWQLFCR (SEQ ID NO:12);

TVWSAHS GPTRMATAIAR (SEQ ID NO:13);

CSSFSRSGKRRGERM (SEQ ID NO:14);

HVLTGCSSHWEVEDLGT (SEQ ID NO:15);

PVLRPRGQPNQCVG (SEQ ID NO:16);

SALPGTSHVL (SEQ ID NO:17);

RDVSTTGSTSEEAVTAVAI (SEQ ID NO:18);

SQSERTARRLQAQ (SEQ ID NO:2); ou GYLTKILHVFHGLLPGLVKMSG-

DLLELA (SEQ ID NO:3).

50. Método de modulação de atividade de PCSK9 em um indivíduo, o método compreendendo administrar ao indivíduo uma molécula de ligação à PCSK9 que modula uma atividade biológica da PCSK9, em que a molécula de ligação à PCSK9 exibe uma ou mais das atividades que seguem:

- (a) inibição da ligação de PCSK9 a uma LDL-R,
- (b) inibição da atividade proteolítica da PCSK9,
- (c) inibição da diminuição dependente de PCSK9 de LDL-R em um hepatócito, e
- (d) inibição de degradação dependente de PCSK9 de LDL-R em células hepáticas.

51. Método de redução do colesterol no plasma em um indivíduo, o método compreendendo administrar ao indivíduo a composição como definido na reivindicação 46 em uma quantidade eficaz para reduzir colesterol no plasma no indivíduo.

52. Método de acordo com a reivindicação 51, em que a quantidade é eficaz para reduzir LDL-c.

53. Método de acordo com a reivindicação 52, em que a concentração do indivíduo de LDL-c no plasma é reduzida em pelo menos 5%, com relação à LDL-c no plasma antes da administração da composição.

54. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o indivíduo está também recebendo terapia com um segundo agente de redução de colesterol.

55. Método de acordo com a reivindicação 54, em que o segundo agente de redução de colesterol é uma estatina.

56. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o indivíduo tem, ou está sob risco de, um distúrbio de lipídeo.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, em que o indivíduo é hipercolesterolêmico ou está sob risco de hipercolesterolemia.

58. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o indivíduo tem, ou está sob risco de, aterosclerose.

59. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o indivíduo tem, ou está sob risco de, um distúrbio cardiovascular.
60. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o indivíduo é intolerante à estatina.
- 5 61. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o indivíduo é resistente à terapia com estatina.
62. Método de acordo com a reivindicação 51, em que, antes da administração da composição, o nível de colesterol no plasma total do indivíduo é 200 mg/dl ou mais.
- 10 63. Método de acordo com a reivindicação 51, em que antes da administração da composição, o nível de LDL-c no plasma do indivíduo é 160 mg/dl ou mais.
64. Método de acordo com a reivindicação 51, em que a composição é administrada intravenosamente.
- 15 65. Molécula de ligação à PCSK9 isolada compreendendo uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo que se liga especificamente a uma PCSK9, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro do pró-domínio de PCSK9 humana dentro ou sobrepondo a um dos que seguem:
- 20 (a) aminoácidos 101-107 da SEQ ID NO: 1; ou
(b) aminoácidos 123-132 da SEQ ID NO: 1.
66. Molécula de ligação à PCSK9 isolada de acordo com a reivindicação 65, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro do pró-domínio de PCSK9 humana dentro ou sobrepondo aos amino-
- 25 ácidos 101-107 da SEQ ID NO:1.
67. Molécula de ligação à PCSK9 isolada de acordo com a reivindicação 65, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo dentro do pró-domínio de PCSK9 humana dentro ou sobrepondo aos amino-
- ácidos 123-132 da SEQ ID NO:1.
- 30 68. Molécula de ligação à PCSK9 isolada que compete com cruzamento para ligação à PCSK9 com uma molécula de ligação à PCSK9 que se liga a um epitopo dentro do pró-domínio de PCSK9 humana dentro ou

sobrepondo a um dos que seguem:

(a) aminoácidos 101-107 da SEQ ID NO: 1; ou

(b) aminoácidos 123-132 da SEQ ID NO: 1.

5 69. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 65-67, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear.

70. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com a reivindicação 69, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo não-linear compreendendo todos ou pelo menos uma porção de cada um dos epitopos
10 que seguem:

(a) aminoácidos 101-107 da SEQ ID NO:1; e

(b) aminoácidos 123-132 da SEQ ID NO:1.

71. Molécula de ligação à PCSK9 isolada compreendendo uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo que se liga especificamente
15 a uma PCSK9, em que a porção de ligação de antígeno se liga dentro dos aminoácidos 101-132 da SEQ ID NO:1.

72. Molécula de ligação à PCSK9 isolada de acordo com a reivindicação 71, em que a porção de ligação de antígeno se liga dentro dos aminoácidos 101-132 da SEQ ID NO:1 e compreende pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO:2 e pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO:3.
20

73. Molécula de ligação à PCSK9 isolada compreendendo uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo que se liga especificamente a uma PCSK9, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo que sobrepõe a pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO:2 e a pelo menos
25 um aminoácido da SEQ ID NO:3.

74. Molécula de ligação à PCSK9 isolada compreendendo uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo que se liga especificamente a uma PCSK9, em que a porção de ligação de antígeno se liga a um epitopo selecionado do grupo consistindo em um epitopo dentro da SEQ ID NO:2, um epitopo dentro da SEQ ID NO:3 ou um epitopo que sobrepõe a pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO:2 e a pelo menos um aminoácido da SEQ ID NO:3.
30

75. Molécula de ligação à PCSK9 isolada de acordo com a reivindicação 73 ou 74, em que o aminoácido da SEQ ID NO:2 é glutamina.

76. Molécula de ligação à PCSK9 isolada de acordo com a reivindicação 73 ou 74, em que a porção de ligação de antígeno sobrepõe a
5 pelo menos dois aminoácidos da SEQ ID NO:3.

77. Molécula de ligação à PCSK9 isolada de acordo com a reivindicação 76, em que os aminoácidos são glicina e tirosina.

78. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 65-67 e 69-77, em que o anticorpo é um anticorpo humano, humanizado, humanizado ou quimérico.
10

79. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 65-67 e 69-77, em que a porção de ligação de antígeno é uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo monoclonal ou policlonal.
15

80. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 65-77, em que a molécula de ligação à PCSK9 compreende um fragmento Fab, um Fv de cadeia única, um fragmento Fab', um F(ab')₂, um dícorpo ou um fragmento Fv do anticorpo.

81. Molécula de ligação à PCSK9 de acordo com qualquer uma das reivindicações 65-67 e 69-77, em que a porção de ligação de antígeno é derivada de um anticorpo de um dos isotipos que seguem: IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.
20

82. Uso de uma molécula de ligação à PCSK9 de qualquer uma das reivindicações anteriores para preparar um medicamento para o tratamento de doença associada com níveis de colesterol altos.
25

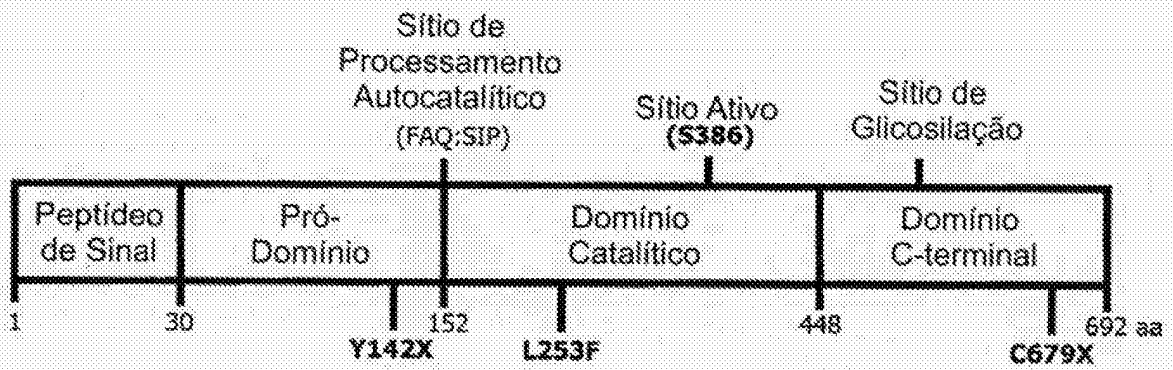


Fig. 1

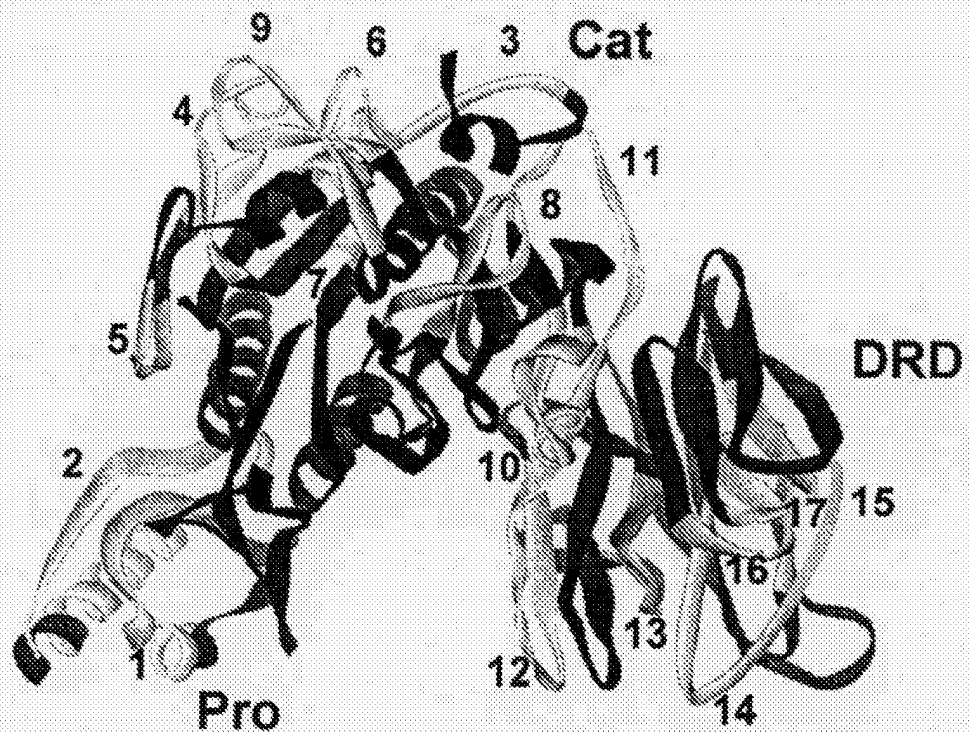
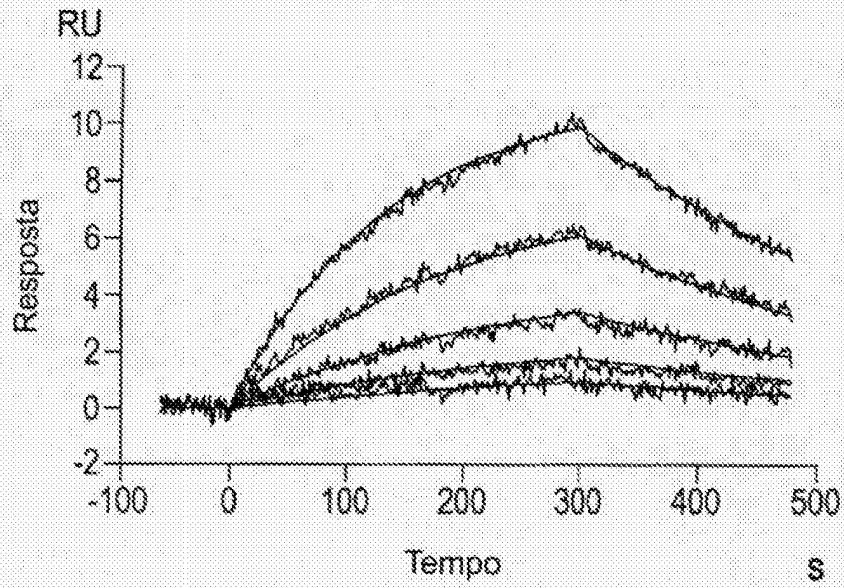
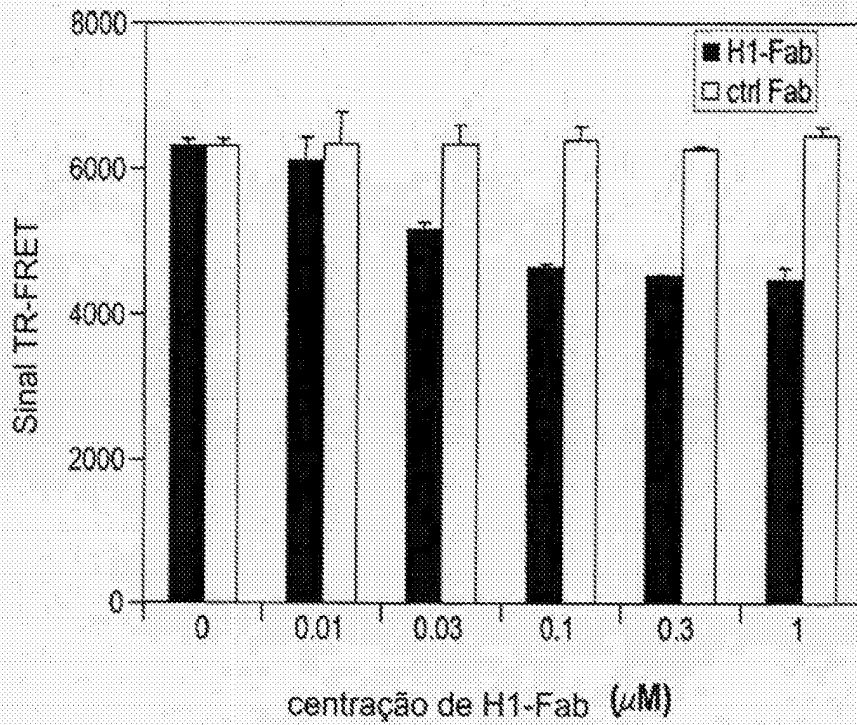
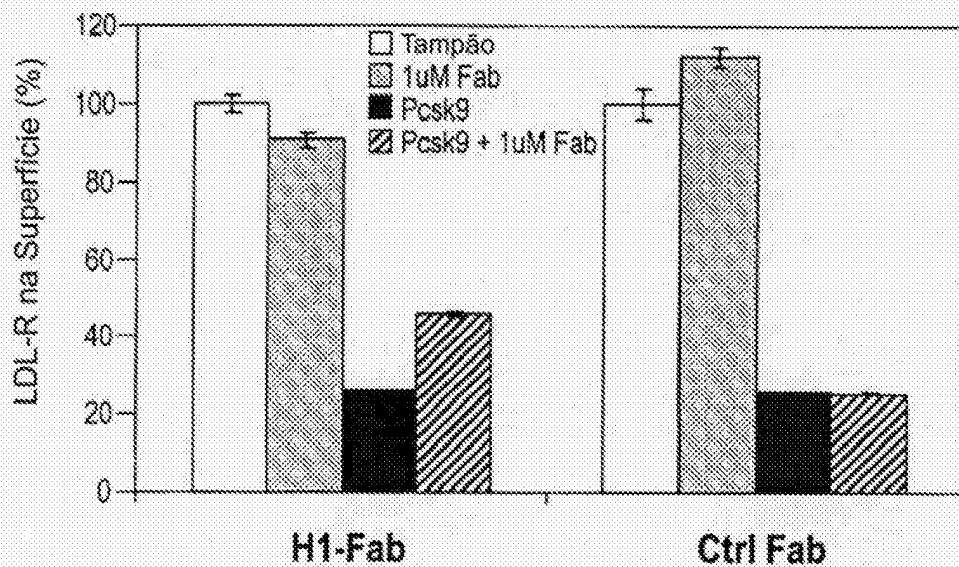
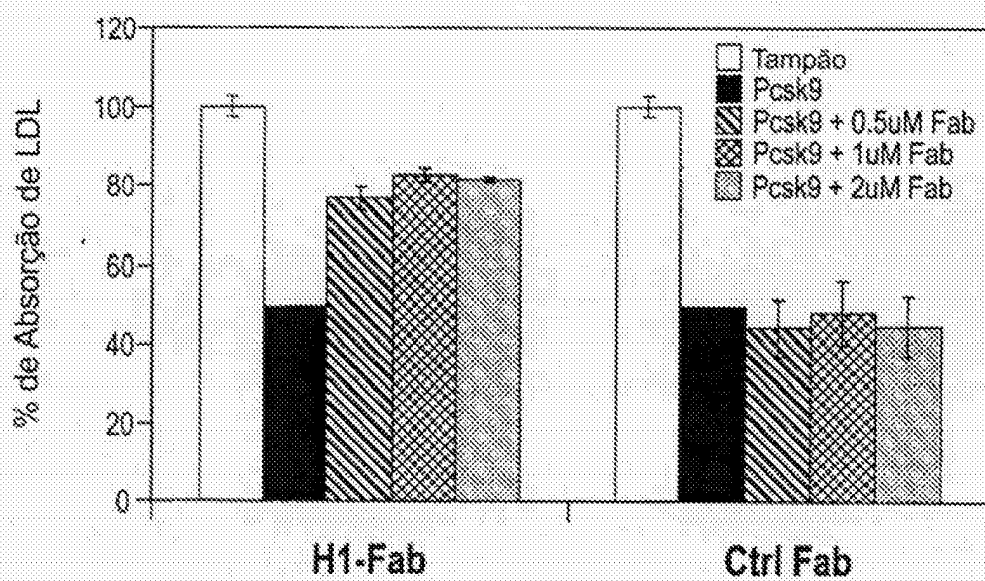
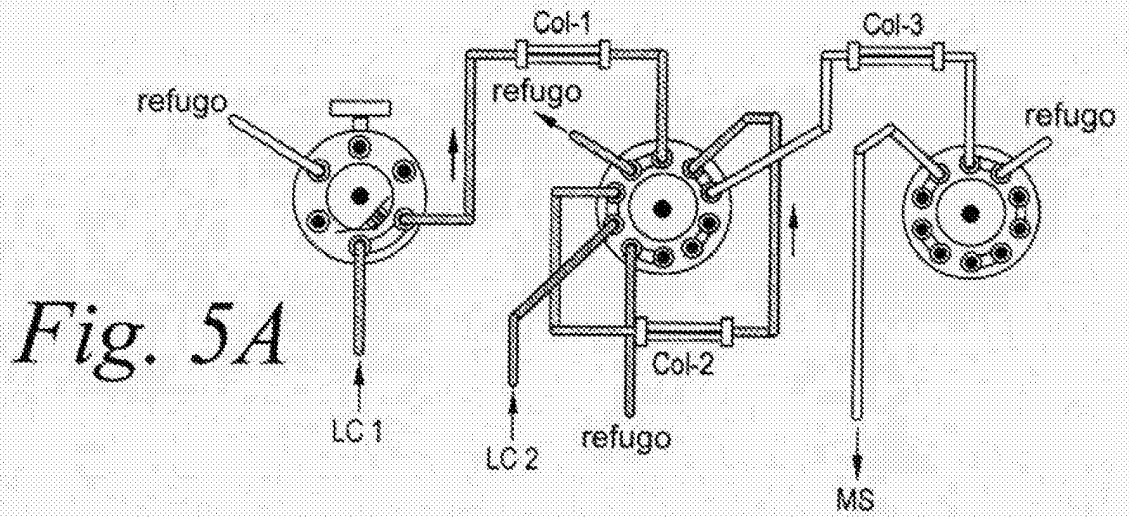
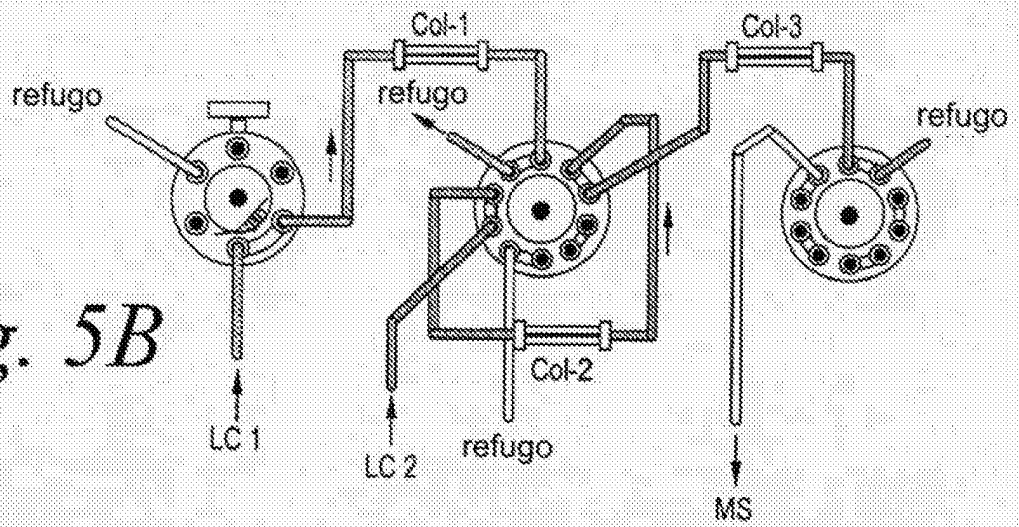
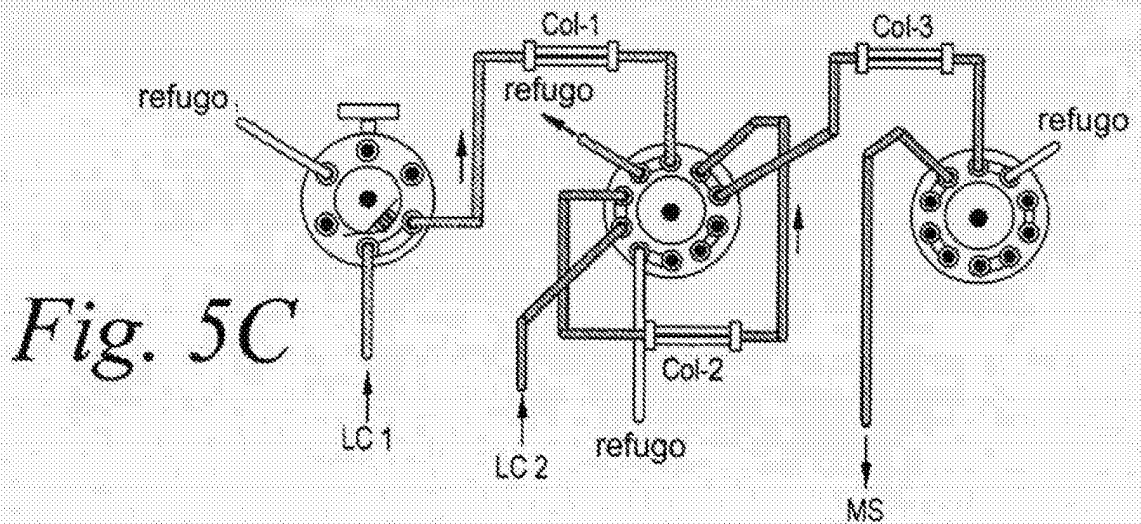
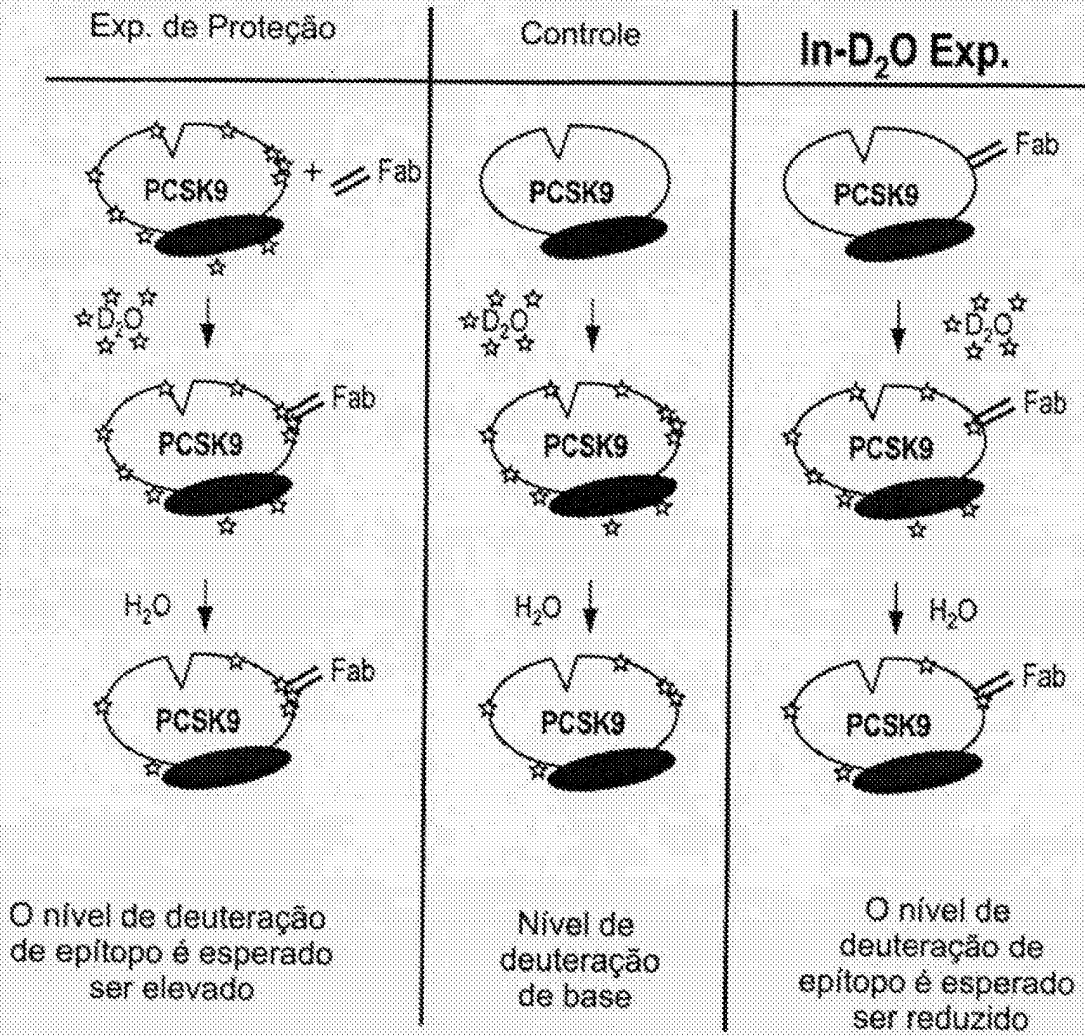


Fig. 2

*Fig. 3**Fig. 4A*

*Fig. 4B**Fig. 4C*

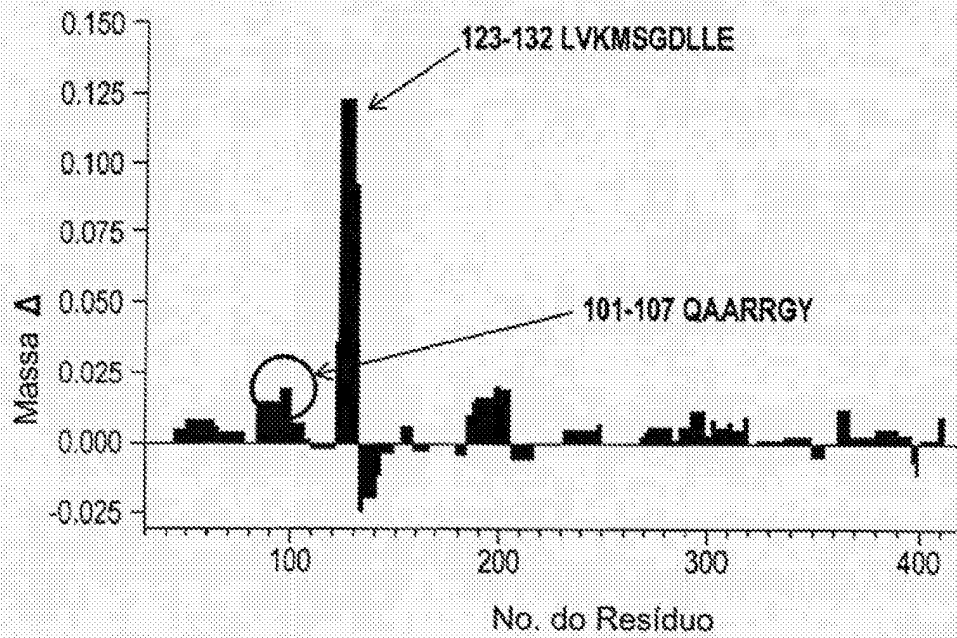
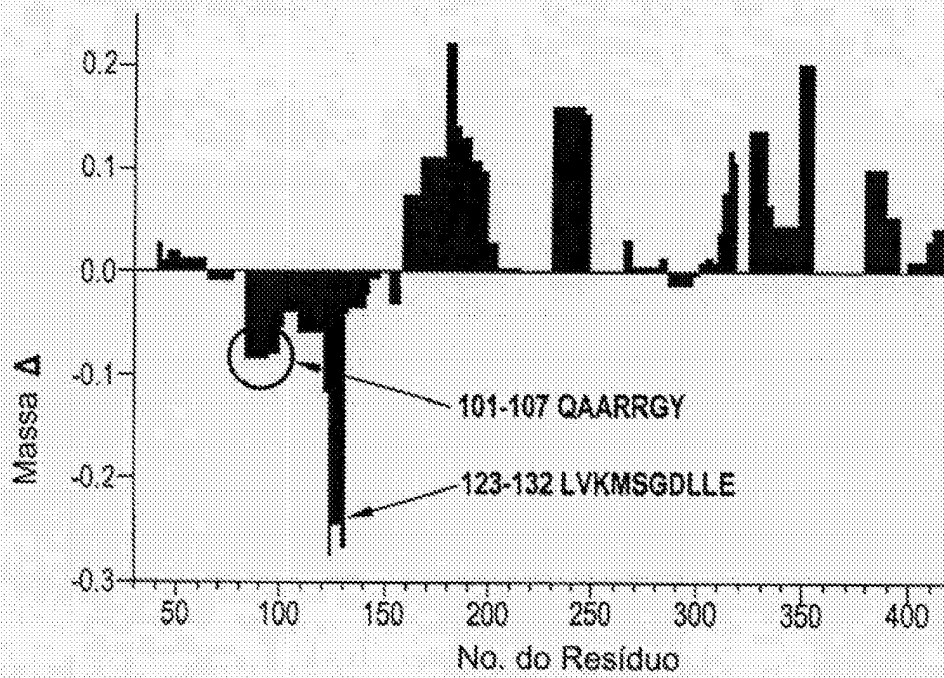
*Fig. 5A**Fig. 5B**Fig. 5C*



Esquema dos experimentos de troca H/D complementares realizados e os resultados esperados.

Fig. 6

Mudança de Massa Média em Exp. de Proteção PCSK9/H1-Fab

*Fig. 7A*Mudança de Massa Média em Experimento PCSK9/H1-Fab In-D₂O*Fig. 7B*

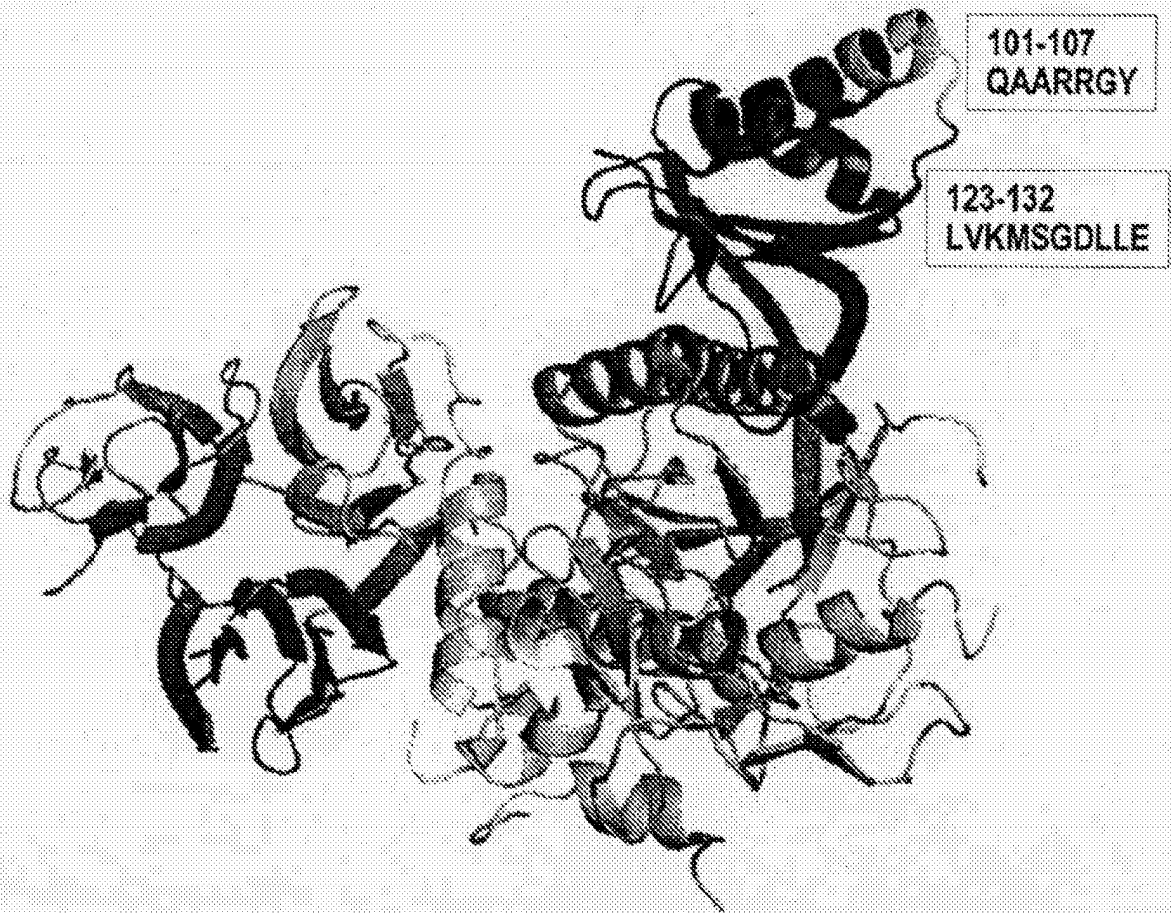


Fig. 8

RESUMO

Patente de Invenção: "MOLÉCULAS E MÉTODOS PARA MODULAÇÃO DA PRÓ-PROTEÍNA CONVERTASE SUBTILISINA/QUEXINA TIPO 9 (PCSK9)".

5 A presente invenção refere-se a epitopos de Pró-proteína convertase subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9), a composições que se ligam à PCSK9 e epitopos de PCSK9 a métodos de uso das composições.