



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



02 078384 OC

PETITORIO

Fr. 31/03/04 00000000
Fecha (IMP): 2002-09-05 16:40:18 Folios: 120 3n
Trámite : 011 PCT-PATENT 273 FINE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE BIENES CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **APPLIED RESEARCH
SYSTEMS ARS HOLDING N.V.**

sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Las Antillas Holandesas

Dirección: Pietermaai 15,
Curaçao,
Antillas Holandesas

Domicilio: Curaçao,
Antillas Holandesas

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número:

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **EMILIO FERRERO**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 217 92 11

E-mail: clientes@camyp.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número: 438.019 T.P. 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1- Nachum YONAH
6 Ramaz St., Gedera, 70700
Israel

3- Hana BELZER
10 Harashba St. Rishon Le
Zion, 75483,
Israel

5- Moshe SMOLARSKY
9 Gluskin St., Rehovot, 76273,
Israel

2- Dany SUISSA
28 Moskowitz St., Rehovot, 76468
Israel

4- Francesco ANTONETTI
Via Amadeo Civalucci 35,
Roma I-00179,
Italia.

6- Michel DREANO
169 Chemin de Boitecreux,
Collonges-sous-Saleve, F-74160,
Francia.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IL 01/00216Publicación Internacional No. WO 01/68710 A1Fecha: 8 de marzo de 2001Fecha : 20 de septiembre de 2001

6

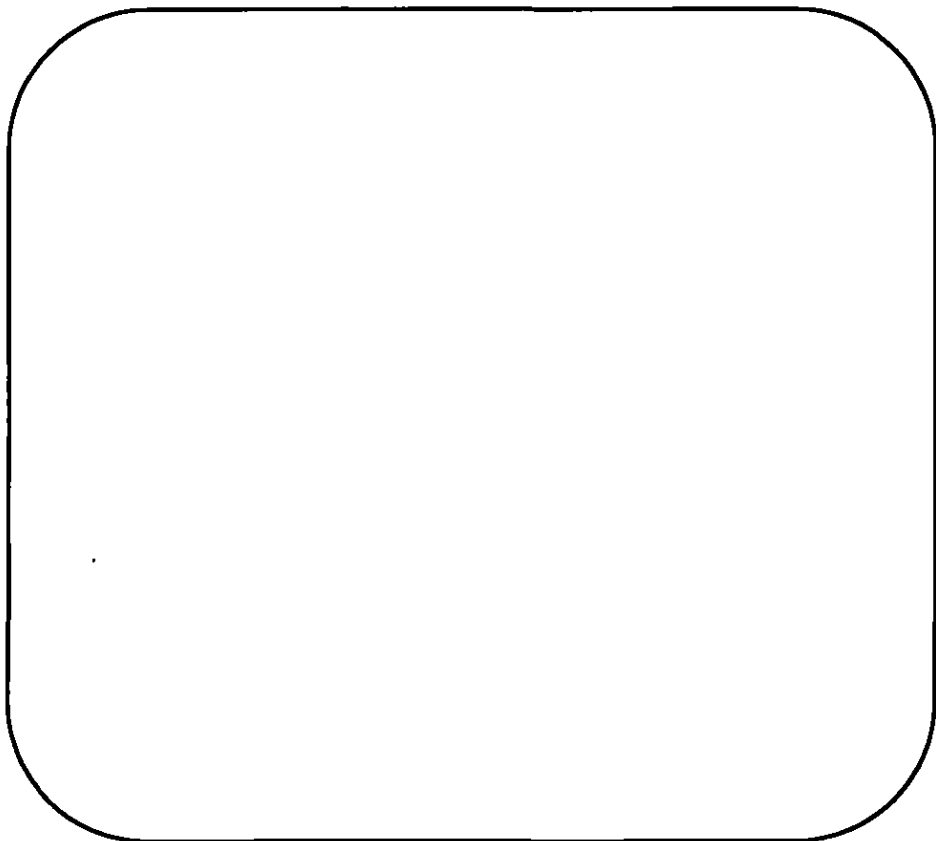
Título (84)

ANTICUERPOS MONOCLONALES AL RECEPTOR LDL HUMANO.
SU PRODUCCION Y USO

7 Clasificación Internacional (51) <u>C07K 16/28</u>			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	<u>IL.</u>	<u>13 de marzo de 2000</u>	<u>135025</u>
	<u>IL.</u>	<u>23 de octubre de 2000</u>	<u>139217</u>
9 Comprobante de pago No.: <u>02-56.216</u> Fecha: <u>26 de agosto de 2002</u>			
10 Anexos: ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por 378.000.00. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. ☐ Poderes, si fuere el caso. ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. ☐ Declaraciones. ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA. ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA. ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso. ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas. ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico. ☐ Arte final 12x12 ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud. ☐ Otros			

11

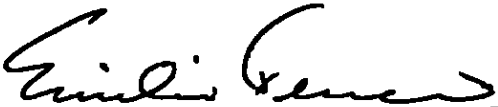
FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA: 

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

JBP/mrm-ld-1

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

(43) International Publication Date
20 September 2001 (20.09.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/68710 A1

(51) International Patent Classification⁷: C07K 16/28.
G01N 33/577, 33/68, C12N 5/20

(74) Agent: EINAV, Henry; Inter-Lab Ltd., Science-based Industrial Park, Kiryat Weizmann, 76110 Ness-Ziona (IL).

(21) International Application Number: PCT/IL01/00216

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) International Filing Date: 8 March 2001 (08.03.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
135025 13 March 2000 (13.03.2000) IL
139217 23 October 2000 (23.10.2000) IL

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (*for all designated States except US*): APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V.
[NL/NL]; Pietermaai 15, Curacao (AN).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): YONAH, Nachum [IL/IL]; Remez Street 6, 70700 Gedera (IL), SUISSA, Dany [IL/IL]; Moskowitz Street 28, 76468 Rehovot (IL), BELZER, Ilana [IL/IL]; Harashba Street 10, 75483 Risbon Le-Zion (IL).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/68710 A1

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE HUMAN LDL RECEPTOR, THEIR PRODUCTION AND USE

(57) Abstract: There are provided monoclonal antibodies to the human LDL receptor which are useful for the identification and purification of LDL and in treatment of e.g. hepatitis C infection.

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 396PCT	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IL 01/00216	International filing date (day/month/year) 08/03/2001	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 13/03/2000
Applicant APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V. et al.		

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

This International Search Report consists of a total of 5 sheets.



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

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:



contained in the international application in written form.



filed together with the international application in computer readable form.



furnished subsequently to this Authority in written form.



furnished subsequently to this Authority in computer readable form.



the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.



the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.



as suggested by the applicant.



because the applicant failed to suggest a figure.



because this figure better characterizes the invention.



None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

6

PCT/IL 01/00216

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/28 G01N33/577 G01N33/68 C12N5/20

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C. XIE ET AL.: "Preparation and properties of monoclonal antibodies against low density lipoprotein (LDL) receptors." ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA SINICA, vol. 23, no. 3, 1991, pages 189-195, XP001015474 Shanghai, Peoples Republic of China English abstract --- -/--	1,2,9, 10,12,23



Further documents are listed in the continuation of box C.



Parent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 August 2001

Date of mailing of the international search report

22/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Noo1J, F

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	I. VAN DRIEL ET AL.: "Stoichiometric binding of low density lipoprotein (LDL) and monoclonal antibodies to LDL receptors in a solid phase assay." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 16, 5 June 1989 (1989-06-05), pages 9533-9538. XP002174321 Baltimore, MD, USA the whole document	1,2,9, 10,12, 23-25
X	M. CARUSO ET AL.: "Demonstration of low density lipoprotein receptor in human colonic carcinoma and surrounding mucosa by immunoenzymatic assay." ITALIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, vol. 25, no. 7, August 1993 (1993-08), pages 361-367, XP001015472 Padova, Italy page 362, right-hand column, line 10 - line 22	1,2, 8-10,12
X	T. NISHIKAWA ET AL.: "Beta-migrating very low density lipoproteins induce foam cell formation in mouse mesangial cells." ATHEROSCLEROSIS, vol. 114, no. 1, 7 April 1995 (1995-04-07), pages 123-132, XP001015467 Amsterdam, The Netherlands page 125, left-hand column, line 47 -right-hand column, line 4 figures 3,5	1,2,9,12
A	V. AGNELLO ET AL.: "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE U.S.A., vol. 96, no. 22, 26 October 1999 (1999-10-26), pages 12766-12771, XP002174322 Washington, DC, USA cited in the application abstract page 12766, right-hand column, line 1 - line 3	1-25
A	US 5 945 308 A (TANG ET AL.) 31 August 1999 (1999-08-31) column 20, line 40 -column 21, line 23 column 36, line 33 -column 37, line 8 -/--	1-25

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
P,X	DATABASE WPI Week 0102 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 2001-011101 XP002174323 & JP 2000 279174 A (BML KK), 10 October 2000 (2000-10-10) abstract -----	1,2,9. 10,12, 23-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IL 01/00216

9

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5945308 A	31-08-1999	AU 3453499 A EP 1068236 A WO 9951640 A	25-10-1999 17-01-2001 14-10-1999
JP 2000279174 A	10-10-2000	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL 01/00216

10

Box III TEXT OF THE ABSTRACT (Continuation of item 5 of the first sheet)

There are provided monoclonal antibodies to the human LDL receptor which are useful for the identification and purification of LDL and in treatment of e.g. hepatitis C infection.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 396PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/IL 01/00216	International filing date (day/month/year) 08/03/2001	Priority date (day/month/year) 13/03/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K16/28		
Applicant APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V. et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 2 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consists of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 07/10/2001	Date of completion of this report 12/04/2002
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Authorized officer BOUTRUCHE J E E Tel. (+49-89) 2399 2828

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (July 1998)



I. Basis of the report

The basis of this international preliminary examination is the application as originally filed.

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in at least some of the claims does not appear to meet the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. does not appear to be novel and/or to involve an inventive step (see international search report, in particular the documents cited X and/or Y and corresponding claim references).

C 13

1

MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE HUMAN LDL RECEPTOR, THEIR PRODUCTION AND USE

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to monoclonal antibodies which
5 specifically recognise the human receptor for low-density lipoproteins (LDLR). These antibodies are useful e.g. for the identification and purification of human soluble LDLR (hsLDLR) in production processes as well as in the identification and treatment of diseases such as, hepatitis C infection (HCV).

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Cholesterol, a component of all eukaryotic plasma membranes, is essential for the growth and viability of cells in higher organisms. However, high serum levels of cholesterol cause disease and death by contributing to the formation of atherosclerotic plaques in arteries throughout the body. The major site of cholesterol synthesis in mammals is the liver. Appreciable amounts of
15 cholesterol are also formed by the intestine. The rate of cholesterol formation by these organs is highly responsive to the amount of cholesterol absorbed from dietary sources. Cells outside of the liver and intestine acquire cholesterol from the plasma rather than by synthesising it *de novo*. Cholesterol and other lipids are transported in body fluids by lipoproteins, which are classified according to
20 increasing density. A lipoprotein is a particle consisting of a core of hydrophobic lipids surrounded by a shell of polar lipids and apoproteins. These lipoproteins have two roles: they solubilize highly hydrophobic lipids and they contain signals that regulate the movement of particular lipids in and out of specific target cells and tissues. Cholesterol is transported in body fluids by low-density lipoproteins
25 (LDL) which binds to a specific receptor on the plasma membrane of non hepatic cells. The receptor-LDL complex is then internalised into the cells by a transport mechanism known as receptor mediated endocytosis (Goldstein et al. 1979). The low density lipoprotein (LDL) receptor is the prototype of a family of structurally

related cell surface receptors that mediate endocytosis of multiple ligands in mammalian cells.

The LDL receptor consists of 822 amino acid residues and exhibits a molecular weight of 164000. It is composed of several domains some of which share sequence homology with other proteins. Its NH₂-terminal ligand-binding domain consists of 292 residues, arranged in 7 cysteine-rich imperfect repeats. Each repeat contains six cysteine residues which are disulphide bonded in the pattern one to three, two to five, and four to six. (Bieri et al. 1995). This domain is followed by four additional domains: the first consists of 400 amino acid residues and is homologous to the EGF receptor, the second consists of 58 amino acid residues rich in O-linked sugars, the third is a single trans-membrane domain of 22 amino acid residues and the fourth is a cytoplasmic domain of 50 amino acid residues (Sudhof et al. 1985), (Brown et al. 1986).

The physiologic importance of the LDL receptor was revealed by Brown and Goldstein's studies on familial hypercholesterolemia (FH). The disease was found to be due to a molecular genetic defect resulting in the absence or deficiency of functional receptors for LDL (Brown et al. 1976). Several classes of FH mutations have been characterised. (Goldstein et al. 1975).

A soluble form of the sLDLR exhibiting antiviral activity was identified and isolated from the culture supernatant of interferon-induced cells (Fischer et al. 1993) and in body fluids (Fischer et al. 1994). Several interferon-induced proteins have been identified that are instrumental in the induction of the antiviral state by IFNs. One such protein exhibiting antiviral activity was produced and accumulated in the culture supernatant of human amnion WISH cells. This protein was purified to homogeneity and identified as the sLDLR (see EP 0 553 667 and Fischer et al. 1993). The sLDLR was found to be secreted into the medium by mammalian cells that enter an antiviral state in response to interferon. In contrast to interferon, sLDLR does not induce an antiviral state in the cells but is antiviral by itself. It was found that sLDLR apparently has to be present throughout the process of viral replication maturation and budding suggesting it might be involved in a complex process that leads to the inhibition of virus assembly or budding (unpublished data). Endocytosis of the hepatitis C virus has been

recently shown to be mediated by LDL receptors on cultured cells (Agnello et al. 1999). These and other findings suggest that the family of LDL receptors may serve as viral receptors. Therefore, antibodies raised against the sLDLR receptor may block the entry and budding of viral particles by binding to the cellular LDL receptor.

The only available monoclonal antibody to LDLR known so far is C7, an antibody to bovine LDLR (Beisiegel et al. 1981, commercially available from Amersham, UK) which was prepared by immunization of mice with the bovine adrenal cortex LDLR purified to homogeneity. Membranes from the bovine adrenal cortex were solubilized and the receptor was partially purified by elution from a DEAE-cellulose column (Beisiegel et al. 1981). The antibody to the bovine LDLR only weakly cross-reacts with human LDLR.

In fact, the C7 Mab to bovine LDLR was found to have significant disadvantages when used for detection and quantitation of recombinant human LDLR:

- a) It has very low affinity to the human LDLR
- b) It significantly cross reacts with cell culture derived impurities

Specific antibodies to human LDLR were not previously available. This appears surprising since it is very common to raise antibodies against novel proteins, be it for purification, identification or for assay development purposes. It is possible that such antibodies have not been generated so far, since a condition for generating monoclonal antibodies is the availability of sufficiently large amounts of highly purified antigen which allow efficient immunization of mice. A highly purified antigen is one which appears as a single major peak in RP-HPLC. Furthermore methods for identification and quantitation of the antigen during purification processes were not easy to establish. In accordance with the invention, the antiviral activity assay described herein was employed for the identification of LDLR during purification processes.

There exists a need to generate specific Mabs to human soluble LDLR to provide the means for developing an efficient immunoassay (ELISA) and for the identification of the protein in Western blot. These antibodies are required for the

monitoring and quantitation of the recombinant human soluble LDLR during development of the production and purification processes of the recombinant protein and for detection of the natural protein.

5 **SUMMARY OF THE INVENTION**

The present invention allows the generation of hybridoma cells lines producing monoclonal antibodies capable of specifically recognising and binding the human LDL receptor and fragments thereof.

10 More specifically the present invention allows the generation of hybridoma cells lines producing monoclonal antibodies capable of specifically recognising and binding the human soluble LDL receptor.

15 Thus the present invention relates to a monoclonal antibody, chimeric antibody, humanized antibody, anti-anti-Id antibody or fragment thereof which specifically recognises and binds the human LDL receptor and fragments thereof, except monoclonal antibody C7.

The present invention provides such monoclonal antibodies that recognise and bind the human soluble LDLR and meet the following needs:

- 1. Mabs that can be used as a pair in an ELISA, e.g. a sandwich ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) for detection of human soluble
20 LDLR.
- 2. Mabs that can be used for identification of the LDLR in Western Blot analysis.
- 3. Mabs that can be used to neutralise the antiviral biological activity of the human soluble LDLR.
- 25 4. Mabs that can be used to inhibit virus infection, such as HCV.

The present invention further provides a method for the detection and/or the quantitation of human LDLR which comprises the use of the specific

monoclonal antibodies according to the invention in a known manner for that purpose.

The present invention also provides cloned hybridoma comprising a spleen cell from a mammal immunized with recombinant human LDLR and a homogenic
5 or heterogenic lymphoid cell.

A monoclonal antibody according to the invention is prepared in a conventional manner, e.g. by growing a cloned hybridoma comprising a spleen cell from a mammal immunized with hsLDL and a homogenic or heterogenic lymphoid cell in liquid medium or mammalian abdomen to allow the hybridoma
10 to produce and accumulate the monoclonal antibody.

The invention, in yet another aspect, provides a method for purifying the human LDLR which comprises contacting a material containing crude LDLR with a monoclonal antibody according to the invention. A column with adsorbed LDLR specific monoclonal antibody may be used as an affinity purification step,
15 in the purification process of the recombinant protein.

A method for detecting and measuring recombinant human LDLR which comprises using as antibody the monoclonal antibodies of the present invention in an ELISA assay as described in example 5.

As the LDLR or fragment of a LDLR for immunizing animals any LDLR
20 can be used as long as it is the LDLR of a warm-blooded mammal. A mutein of LDLR can be also used. A representative example of such a mammalian human soluble LDLR is the soluble LDLR +291 form which includes the amino acid sequence beginning at amino acid Asp at position +4 and ending with amino acid Glu at position +291 of the sequence of the human LDLR, any other form may be
25 used as well, such as the +292 form etc.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows a flow chart depicting the development of monoclonal antibodies to r-hsLDLR.

Figure 2 shows a Western blot analysis of the +291 form of r-hsLDLR in lane 1, the urinary hsLDLR in lane 2 and recombinant human p55 TNF receptor as a negative control (r-hTBP-1) in lane 3, with the monoclonal antibodies indicated beneath each strip. The arrows to the left of the figure indicate the position of the molecular weight markers and the arrows to the right of the figure point to the position of the hsLDLR form indicated above each arrow.

Figure 3 shows the effects of Mabs 12.6, 28 and 29.8 on the production of HCV(+) and (-) strands in culture FT167. Cells were treated 30 minutes before infection with MAb anti-LDLR (8 or 2 µg/ml). Then, cells were infected overnight with 25 µl of HCV(+) serum (N° 42;1b). The day after infection, three washes were performed and new medium was added and changed every 48 hours. Five days after infection, the hepatocytes were harvested, RNA was purified and 1 µg cellular RNA was analyzed by rTth RT-PCR (Perkin Elmer). Assays were performed in duplicate.

+ SP : positive-strand RNA assay; - SP : negative-strand RNA assay; X : blank.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Monoclonal antibodies (Mabs) to human soluble LDLR (hsLDLR) were generated. Using these monoclonal antibodies, an ELISA and a Western blotting procedure for the identification of hsLDLR and a neutralising assay to the antiviral activity of hsLDLR were developed.

The Mabs were generated in mice, immunized with the recombinant +291 form of hsLDLR, which consists of the N-terminal ligand binding domain of the human soluble LDLR, from Asp +4 to Glu +291. The recombinant +291 form of hsLDLR, was produced in CHO cells and purified to homogeneity.

The immunized mice produced significant titres of specific antibodies. After screening of hybridomas, five clones (numbers 12, 28, 29, 30 and 50) were identified as the highest antibody producers. These clones were selected for further subcloning. After subcloning, 29 subclones which had high antibody

productivity were isolated and ampoules from the parent clones and from the subclones were frozen.

A pair of monoclonal antibodies was chosen for the ELISA to the r-hsLDLR. Mab 28 was selected as the coating antibody, and Mab 29.8, labelled with biotin, was chosen as the second antibody. Mabs 12.6 and 29.8 were found to be suitable for the identification of the native and recombinant hsLDLR in Western blot analysis and Mabs 28 and 30 were found to be suitable for the identification of the recombinant hsLDLR in Western blot analysis. Mabs 12.6 and 50.30 were found to be suitable for inhibiting the antiviral activity of hsLDLR.

It was also found in accordance with the invention that Mabs 12.6, 28 and 29.8 inhibit replication of the viral genome of hepatitis C virus (HCV) in human hepatocytes primary cultures. Thus, these antibodies may be used for the treatment of hepatitis C infection (Figure 3).

The subclass isotype of the Mab produced by the clones was determined. Clones 12.6, 28, 29.8 and 30 were identified as IgG₁ whereas clone 50.30 was found to be IgM.

The Mabs, developed against the +291 form of the hsLDLR recognised also other forms of the hsLDLR, i.e. the +292 form and the +331 form of the r-hsLDLR produced in recombinant CHO cells, in ELISA and in Western blot analysis. The +292 form comprises the N-terminus part of the receptor from amino acid residue Asp +4 to Cys +292 and the +331 form comprises the N-terminus part of the receptor from amino acid residue Asp +4 to Cys +331.

The antigen used to immunize mice for generating monoclonal antibodies was the r-hsLDLR +291 form, which was produced in CHO cells. Production of the r-hsLDLR was performed in bioreactors, using the stationary phase Fibracel matrix system. The r-hsLDLR was purified to homogeneity and used for immunizing mice.

Immune spleen cells from the best mouse responder were used for fusion and generation of hybridomas.

As regards the antibodies mentioned herein throughout, the term "monoclonal antibody" is meant to include monoclonal antibodies, chimeric antibodies, fully humanized antibodies, antibodies to anti-idiotypic antibodies (anti-anti-Id antibody) that can be labeled in soluble or bound form, as well as
5 fragments thereof provided by any known technique, such as, but not limited to enzymatic cleavage, peptide synthesis or recombinant techniques.

A monoclonal antibody contains a substantially homogeneous population of antibodies specific to antigens, which populations contains substantially similar epitope binding sites. Mabs may be obtained by methods known to those
10 skilled in the art. See, for example Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975); U.S. Patent No. 4,376,110; Ausubel et al., eds., Harlow and Lane *ANTIBODIES : A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); and Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience N.Y., (1992-1996), the contents of
15 which references are incorporated entirely herein by reference. Such antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, GILD and any subclass thereof. A hybridoma producing a mAb of the present invention may be cultivated *in vitro*, *in situ* or *in vivo*. Production of high titers of Mabs *in vivo* or *in situ* makes this the presently preferred method of production.

20 Chimeric antibodies are molecules of which different portions are derived from different animal species, such as those having the variable region derived from a murine Mab and a human immunoglobulin constant region. Chimeric antibodies are primarily used to reduce immunogenicity in application and to increase yields in production, for example, where murine Mabs have higher
25 yields from hybridomas but higher immunogenicity in humans, such that human/murine chimeric Mabs are used. Chimeric antibodies and methods for their production are known in the art (Cabilly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3273-3277 (1984); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al., *Nature* 312:643-646 (1984); Cabilly et al., European
30 Patent Application 125023 (published November 14, 1984); Neuberger et al., *Nature* 314:268-270 (1985); Taniguchi et al., European Patent Application 171496 (published February 19, 1985); Morrison et al., European Patent Application 173494 (published March 5, 1986); Neuberger et al., PCT

Application WO 8601533. (published March 13, 1986); Kudo et al., European Patent Application 184187 (published June 11, 1986); Sahagan et al., *J. Immunol.* 137:1066-1074 (1986); Robinson et al., International Patent Application No. WO8702671 (published May 7, 1987); Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84:3439-3443 (1987); Sun et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84:214-218 (1987); Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327. and Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, supra. These references are entirely incorporated herein by reference.

“Fully humanized antibodies” are molecules containing both the variable and constant region of the human immunoglobulin. Fully humanized antibodies can be potentially used for therapeutic use, where repeated treatments are required for chronic and relapsing diseases such as autoimmune diseases. One method for the preparation of fully human antibodies consist of “humanization” of the mouse humoral immune system, i.e. production of mouse strains able to produce human Ig (Xenomice), by the introduction of human immunoglobulin (Ig) loci into mice in which the endogenous Ig genes have been inactivated. The Ig loci are exceedingly complex in terms of both their physical structure and the gene rearrangement and expression processes required to ultimately produce a broad immune response. Antibody diversity is primarily generated by combinatorial rearrangement between different V, D, and J genes present in the Ig loci. These loci also contain the interspersed regulatory elements, which control antibody expression, allelic exclusion, class switching and affinity maturation. Introduction of unrearranged human Ig transgenes into mice has demonstrated that the mouse recombination machinery is compatible with human genes. Furthermore, hybridomas secreting antigen specific hu-mAbs of various isotypes can be obtained by Xenomice immunisation with antigen.

Fully humanized antibodies and methods for their production are known in the art (Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997); Buggemann et al., *Eur. J. Immunol.* 21:1323-1326 (1991); Tomizuka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727 (2000) Patent WO 98/24893.

An anti-idiotypic (anti-Id) antibody is an antibody which recognizes unique determinants generally associated with the antigen-binding site of an antibody. An Id antibody can be prepared by immunizing an animal of the same

species and genetic type (e.g. mouse strain) as the source of the Mab to which an anti-Id is being prepared. The immunized animal will recognize and respond to the idiotypic determinants of the immunizing antibody by producing an antibody to these idiotypic determinants (the anti-Id antibody). See, for example, U.S. Patent No. 4,699,880, which is herein entirely incorporated by reference.

The anti-Id antibody may also be used as an "immunogen" to induce an immune response in yet another animal, producing a so-called anti-anti-Id antibody. The anti-anti-Id may be epitopically identical to the original Mab, which induced the anti-Id. Thus, by using antibodies to the idiotypic determinants of a Mab, it is possible to identify other clones expressing antibodies of identical specificity.

Accordingly, Mabs generated against LDLR, its isoforms, analogs, fragments or derivatives of the present invention may be used to induce anti-Id antibodies in suitable animals, such as BALB/c mice. Spleen cells from such immunized mice are used to produce anti-Id hybridomas secreting anti-Id Mabs. Further, the anti-Id Mabs can be coupled to a carrier such as keyhole limpet hemocyanin (KLH) and used to immunize additional BALB/c mice. Sera from these mice will contain anti-anti-Id antibodies that have the binding properties of the original Mab specific for an epitope of the above LDLR protein, or analogs, fragments and derivatives thereof.

The anti-Id Mabs thus have their own idiotypic epitopes, or "idiotopes" structurally similar to the epitope being evaluated. The term "monoclonal antibody" is also meant to include both intact molecules as well as fragments thereof, such as, for example, Fab and F(ab')₂, which are capable of binding antigen. Fab and F(ab')₂ fragments lack the Fc fragment of intact antibody, clear more rapidly from the circulation, and may have less non-specific tissue binding than an intact antibody (Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983)).

It will be appreciated that Fab and F(ab')₂ and other fragments of the antibodies useful in the present invention may be used for the detection and quantitation of the LDLR protein according to the methods disclosed herein for intact antibody molecules. Such fragments are typically produced by proteolytic cleavage, using enzymes such as papain (to produce Fab fragments) or pepsin (to produce F(ab')₂ fragments).

A monoclonal antibody is said to be "capable of binding" a molecule if it is capable of specifically reacting with the molecule to thereby bind the molecule to the antibody. The term "epitope" is meant to refer to that portion of any molecule capable of being bound by an antibody, which can also be recognized
5 by that antibody. Epitopes or "antigenic determinants" usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and have specific three dimensional structural characteristics as well as specific charge characteristics.

An "antigen" is a molecule or a portion of a molecule capable of being
10 bound by an antibody, which antigen is additionally capable of inducing an animal to produce antibody capable of binding to an epitope of that antigen. An antigen may have one or more than one epitope. The specific reaction referred to above is meant to indicate that the antigen will react, in a highly selective manner, with an epitope on its corresponding antibody and not with the multitude
15 of other antibodies which may be evoked by other antigens.

The antibodies, including fragments of antibodies, useful in the present invention may be used to quantitatively or qualitatively detect the LDLR proteins in a sample or to detect presence of cells that express the LDLR proteins of the present invention. This can be accomplished by immunofluorescence techniques
20 employing a fluorescently labeled antibody (see below) coupled with fluorescence microscopy, flow cytometric, or fluorometric detection.

The antibodies (or fragments thereof) useful in the present invention may be employed histologically, as in immunofluorescence or immunoelectron microscopy, for *in situ* detection of the LDLR proteins of the present invention.
25 *In situ* detection may be accomplished by removing a histological specimen from a patient, and providing the labeled antibody of the present invention to such a specimen. The antibody (or fragment) is preferably provided by applying or by overlaying the labeled antibody (or fragment) to a biological sample. Through the use of such a procedure, it is possible to determine not only the presence of
30 the LDLR proteins but also its distribution on the examined tissue. Using the present invention, those of ordinary skill will readily perceive that any of wide variety of histological methods (such as staining procedures) can be modified in order to achieve such *in situ* detection.

Such assays for the LDLR proteins of the present invention typically comprises incubating a biological sample, such as a biological fluid, a tissue extract, freshly harvested cells such as lymphocytes or leukocytes, or cells which have been incubated in tissue culture, in the presence of a labeled antibody
5 capable of identifying the LDLR proteins, and detecting the antibody by any of a number of techniques well known in the art.

The biological sample may be coupled to a solid phase support or carrier such as nitrocellulose, or other solid support or carrier which is capable of immobilizing cells, cell particles or soluble proteins. The support or carrier may
10 then be washed with suitable buffers followed by treatment with a labeled antibody in accordance with the present invention, as noted above. The solid phase support or carrier may then be washed with the buffer a second time to remove unbound antibody. The amount of bound label on said solid support or carrier may then be detected by conventional means.

15 By "solid phase support", "solid phase carrier", "solid support", "solid carrier", "support" or "carrier" is intended any support or carrier capable of binding antigen or antibodies. Well-known supports or carriers, include glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon amyloses, natural and modified celluloses, polyacrylamides, gabbros and magnetite. The nature of the
20 carrier can be either soluble to some extent or insoluble for the purposes of the present invention. The support material may have virtually any possible structural configuration so long as the coupled molecule is capable of binding to an antigen or antibody. Thus, the support or carrier configuration may be spherical, as in a bead, cylindrical, as in the inside surface of a test tube, or the
25 external surface of a rod. Alternatively, the surface may be flat such as a sheet, test strip, etc. Preferred supports or carriers include polystyrene beads. Those skilled in the art will know many other suitable carriers for binding antibody or antigen, or will be able to ascertain the same by use of routine experimentation.

The binding activity of a given lot of antibody, of the invention as noted
30 above, may be determined according to well-known methods. Those skilled in the art will be able to determine operative and optimal assay conditions for each determination by employing routine experimentation.

Other such steps as washing, stirring, shaking, filtering and the like may be added to the assays as is customary or necessary for the particular situation.

One of the ways in which an antibody in accordance with the present invention can be labeled is by linking the same to an enzyme and used in an enzyme immunoassay (EIA). This enzyme, in turn, when later exposed to an appropriate substrate, will react with the substrate in such a manner as to produce a chemical moiety which can be detected, for example, by spectrophotometric, fluorometric or by visual means. Enzymes which can be used to detectably label the antibody include, but are not limited to, malate dehydrogenase, staphylococcal nuclease, delta-5-steroid isomerase, yeast alcohol dehydrogenase, alpha-glycerophosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucoamylase and acetylcholin-esterase. The detection can be accomplished by colorimetric methods which employ a chromogenic substrate for the enzyme. Detection may also be accomplished by visual comparison of the extent of enzymatic reaction of a substrate in comparison with similarly prepared standards.

Detection may be accomplished using any of a variety of other immunoassays. For example, by radioactive labeling the antibodies or antibody fragments, it is possible to detect R-PTPase through the use of a radioimmunoassay (RIA). A good description of RIA may be found in Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, by Work, T.S. et al., North Holland Publishing Company, NY (1978) with particular reference to the chapter entitled "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" by Chard, T., incorporated by reference herein. The radioactive isotope can be detected by such means as the use of a g counter or a scintillation counter or by autoradiography.

It is also possible to label an antibody in accordance with the present invention with a fluorescent compound. When the fluorescently labeled antibody is exposed to light of the proper wavelength, its presence can be then detected due to fluorescence. Among the most commonly used fluorescent labeling

compounds are fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycoerythrin, allophycocyanin, o-phthalaldehyde and fluorescamine.

The antibody can also be detectably labeled using fluorescence emitting metals such as ^{152}E , or others of the lanthanide series. These metals can be
5 attached to the antibody using such metal chelating groups as diethylenetriamine pentaacetic acid (ETPA).

The antibody can also be detectably labeled by coupling it to a chemiluminescent compound. The presence of the chemiluminescent-tagged antibody is then determined by detecting the presence of luminescence that arises
10 during the course of a chemical reaction. Examples of particularly useful chemiluminescent labeling compounds are luminol, isoluminol, thionin, acridinium ester, imidazole, acridinium salt and oxalate ester.

Likewise, a bioluminescent compound may be used to label the antibody of the present invention. Bioluminescence is a type of chemiluminescence found
15 in biological systems in which a catalytic protein increases the efficiency of the chemiluminescent reaction. The presence of a bioluminescent protein is determined by detecting the presence of luminescence. Important bioluminescent compounds for purposes of labeling are luciferin, luciferase and aequorin.

An antibody molecule of the present invention may be adapted for
20 utilization in an immunometric assay, also known as a "two-site" or "sandwich" assay. In a typical immunometric assay, a quantity of unlabeled antibody (or fragment of antibody) is bound to a solid support or carrier and a quantity of detectably labeled soluble antibody is added to permit detection and/or quantitation of the ternary complex formed between solid-phase antibody,
25 antigen, and labeled antibody.

Typical, and preferred, immunometric assays include "forward" assays in which the antibody bound to the solid phase is first contacted with the sample being tested to extract the antigen from the sample by formation of a binary solid phase antibody-antigen complex. After a suitable incubation period, the solid
30 support or carrier is washed to remove the residue of the fluid sample, including unreacted antigen, if any, and then contacted with the solution containing an unknown quantity of labeled antibody (which functions as a "reporter molecule"). After a second incubation period to permit the labeled antibody to complex with

the antigen bound to the solid support or carrier through the unlabeled antibody, the solid support or carrier is washed a second time to remove the unreacted labeled antibody.

In another type of "sandwich" assay, which may also be useful with the
5 antigens of the present invention, the so-called "simultaneous" and "reverse" assays are used. A simultaneous assay involves a single incubation step as the antibody bound to the solid support or carrier and labeled antibody are both added to the sample being tested at the same time. After the incubation is completed, the solid support or carrier is washed to remove the residue of fluid
10 sample and uncomplexed labeled antibody. The presence of labeled antibody associated with the solid support or carrier is then determined, as it would be in a conventional "forward" sandwich assay.

In the "reverse" assay, stepwise addition first of a solution of labeled antibody to the fluid sample followed by the addition of unlabeled antibody
15 bound to a solid support or carrier after a suitable incubation period is utilized. After a second incubation, the solid phase is washed in conventional fashion to free it of the residue of the sample being tested and the solution of unreacted labeled antibody. The determination of labeled antibody associated with a solid support or carrier is then determined as in the "simultaneous" and "forward"
20 assays.

The invention will be now illustrated by the following non-limiting examples.

25 **EXAMPLES**

Example 1 Preparation of CHO r-hsLDLR

Stable recombinant CHO cells expressing human soluble LDLR were generated by co-transfection of CHO-DUKX cells lacking the dihydrofolate
30 reductase (DHFR) gene (Urlaub, G. et al., 1980) with two expression vectors: psLDLR01 containing the N-terminal ligand-binding domain of the LDLR,

beginning at amino acid residue Asp (+ 4) up to Glu 291 (+291), and pDHFR, containing the murine gene for DHFR, both controlled by the promoter and transcription termination elements of the SV40 early region. Transfection was performed by cationic liposomes using LipofectAmine (Gibco BRL), according to the protocol described by the manufacturer. Seventy-two hours after transfection cells were transferred to a selective medium lacking deoxy and ribonucleosides and supplemented with 10% dialysed FCS. Cells expressing DHFR activity were able to form colonies, which were isolated by lifting the cells with trypsin-soaked paper discs. The cells were grown and screened for r-hsLDLR activity. The transfected cells were then subjected to gene amplification by MTX, followed by subcloning and selection of the stable producer clones.

r-hsLDLR (+291 form) was produced with cells of a stable CHO producer clone designated #33-10-29-21, in a 5 liter CelliGen bioreactor in serum free medium (Gibco CHO-A-SFM Cat. no. 95-0091DJ). The crude harvest was clarified by filtration through a 0.8-02 μ cartridge filter (Gelman Cat. No. CSS92DSCCK) and concentrated 100 fold over a 5-kDa membrane. The +291 form of the r-hsLDLR used for the first immunizations, was purified using a small scale purification process. In this process a DEAE-Sepharose cation exchange column was used, followed by a hydrophobic interaction step on a Butyl-TSK column followed by an HTP column and a size exclusion chromatography (SEC) step on a Sephacryl 100 column. Fraction #27 of the SEC, was chosen, as it contained a specific antiviral activity of 780 units/ μ g detected in the antiviral assay described in Example 9 below. The protein in this fraction was identified as r-hsLDLR by N-terminal analysis.

A second batch, of CHO +291 r-hsLDLR was purified and used for boost injections of the mice. It was purified using a refined process having an improved yield which included the following steps: a) clarification and concentration x100 of the crude harvest; b) a HQ POROS anion exchange column, and c) two hydrophobic interaction (HIC) steps: capture on a Butyl-TSK column and flow through a Phenyl 5PW column. The unbound fraction from the last HIC step was dialysed and purified over an HS-POROS cation exchange column. The last step was a Hydroxyapatite (HTP) column. The r-hsLDLR

hence obtained was purified to about 90%, eluting as a single major peak in RP-HPLC.

Example 2 Immunization of mice

10 μ g of the purified r-hsLDLR of fraction #27 of the SEC column of Example 1 above, at a concentration of 100 μ g /ml. were homogenised with Complete Freund's Adjuvant (CFA, 50 % v/v) and injected into the footpad of each of five 7 week old Balb/C female mice.

Four weeks after the first immunization, the mice were boosted, intramuscular with 10 μ g of the same fraction of purified r-hsLDLR, in a 50 % (v/v) solution of CFA.

Two weeks after the second injection the mice sera was tested for antibodies to r-hsLDLR, using the direct ELISA described in Example 3 below.

The two mice M-1 and M-2, with the most significant specific immunoreactivity with r-hsLDLR were further boosted, 10 weeks after the second injection, with 10 μ g of the purified r-hsLDLR obtained in the refined purification process described in Example 1 above.

The mice were bled 14 weeks later and tested for antibodies to r-hsLDLR. They were then given two additional boosts of 50 μ g r-hsLDLR in PBS: the first intraperitoneal and the second, two days later, both intraperitoneal and intravenous.

The mice were bled two weeks after the second injection and the antiserum was tested for anti-r-hsLDLR activity by the direct ELISA of Example 3 below. Each antiserum was serially diluted 1:100-1:32,000 and applied in duplicates to a 96 well plate coated with 10U/well of r-hsLDLR purified using the refined purification process described in above Example 1. Assay buffer and DMEM +10% HS containing PBS +1% BSA or Gelatin + 0.05% Tween 20 + 0.05% Thimerosal were used as blanks in the first well of each row. Normal Mouse Serum (NMS) was applied in the same dilution range in the last two rows

as negative controls. The absorbency of the enzymatic reaction was measured with an ELISA reader at 492 and 405 nm.

The results of this test indicated that sera from mouse M-1 had a higher specific immunoreactivity with r-hsLDLR and was therefore sacrificed and spleen cells were collected for fusion with myeloma cells (Eshhar Z, 1985).

Example 3 Direct ELISA for antisera testing and hybridoma clones screening

The direct ELISA for screening for positive antisera was performed as following: 96 wells plates were coated with 100 μ l of r-hsLDLR (purified by the refined purification process of example 1) 100 units/ml (10U/well) in PBS + 1% Gelatine (Sigma, Cat. No. G-7765) +0.9mM Ca^{+2} and 0.5mM Mg^{+2} , pH 5.6, hereinafter referred to as assay buffer, for 90 min. at 37°C with shaking. The plates were washed six times in PBS + 0.05% Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate- Sigma P-1379), hereinafter referred to as wash solution .

Anti serum samples from the immunized mice serially diluted 1:100-1:32,000, or supernatant from hybridoma cell cultures were added to the wells and incubated for 90 min. at 37°C, while shaking, followed by six washes in wash solution.

100 μ l of Horse Radish Peroxidase (HRP)—APA conjugated goat antibody to mouse Fab (Sigma- Cat. NO. 4601-1) diluted 1:1,200 were added to the wells and incubated for 90 min at 37°C, while shaking, and then washed six times with wash solution.

100 μ l of substrate solution (prepared by dissolving one tablet of OPD and one tablet of H_2O_2 in 20 ml water) were added to the wells and incubated at RT for 30 min. The enzymatic reaction was stopped by the addition of 100 μ l /well of 4N HCl.

The absorbency in the 96 wells plates was read using an ELISA reader at 492 and 405 nm and the results were calculated using the four parametric logistic algorithm, by the MultiCalc software of the PC computer linked to the ELISA reader.

Example 4 Fusion, hybridoma preparation, selection of clones and purification of antibodies from ascitis fluids

The fusion process and hybridoma cell selection were performed according to the protocols in Eshhar Z, 1985. Briefly, spleen cells from mouse M-1, boosted 2-4 days before fusion, were fused with myeloma cells by a short incubation with PEG. The PEG was first slowly diluted with DMEM and then completely removed by centrifugation. The cells were re-suspended in DMEM-HAT medium, distributed in 96 wells plates at a concentration of about 3.4×10^4 cells/well and incubated for 10-14 days in an 8% CO₂ incubator at 37 °C. The medium in all the hybridoma wells was changed to DMEM supplemented with 10% Horse Serum (HS) within 10 days. Hybridoma culture supernatant samples were screened for the presence of Mabs to r-hsLDLR by the direct ELISA described in Example 3 above. Assay buffer and DMEM+10% HS were used as blanks, Mab C7 (commercially available from Amersham) and M-1 mouse antiserum were used as positive controls, while a monoclonal antibody to the soluble p55 TNF receptor was used as a negative control. Cells from wells, in which the presence of antibodies was detected in the culture supernatant, were transferred to 24 well plates and then to 25 cm² T-flasks. The expanded cultures were monitored for secretion of Mabs to r-hsLDLR. Ampoules of cells from positive cultures were frozen and stored in liquid nitrogen.

A total of approximately 1000 cultures were screened for detecting antibodies to r-hsLDLR. 54 cultures with the highest immuno-activity were re-tested several times. Five cultures (12, 28, 29, 30 and 50) with the highest activity were cloned by limiting dilution in 96 well plates. Supernatants from the growing clones were tested several times for antibodies to r-hsLDLR, by the direct ELISA.

Cells of positive hybridoma clones were grown in tissue culture flasks in DMEM containing 15% horse serum and ampoules were frozen from part of the cultures. In parallel, cells of different hybridoma clones were injected, to 2-4 mice each, to obtain ascitis fluids. Antibodies were purified from ascitis fluid either by ammonium sulphate precipitation or on a protein G column. Briefly 7.5 ml of ascitis fluid were diluted 1:3 in 20 mM Phosphate buffer pH 7 and loaded

onto a 5 ml Protein G column (C10/10). The column was washed with 20 mM Phosphate buffer pH 7 and the Mabs were eluted with 100 mM Glycine buffer pH 2.7. The pH of the elution fraction was adjusted to 7-7.5 with 1M Tris buffer pH 9.3.

5 Example 5: Screening for pairs of Mabs to be used in ELISA and optimisation of the ELISA parameters

The Mabs purified from the ascitis fluids as in example 4 above were used to perform a set of experiments in a matrix format to select the best suitable pair of Mabs to be used as first and second antibodies in the sandwich ELISA for r-
10 hsLDLR described in Example 6 below. Briefly, 96 well plates were coated with ascitis fluids derived from five hybridomas (# 12, 28.28, 29.08, 30 and 50.05) purified either by ammonium sulphate precipitation or on a protein G column. The antibodies were screened using the +291 form as well as the +292 (from amino acid residue Asp + 4 to Cys + 292) and +331 (from amino acid residue
15 Asp + 4 to Cys + 331) forms of r-hsLDLR produced in CHO cells, as antigens. One ml of each of the above partially purified Mabs was labelled with biotin for a fast screening of their suitability as second antibodies in a sandwich ELISA. Briefly 1.5 mg of ammonium sulphate precipitation-purified Mabs were adjusted to pH 8.5 with 30 µl of 0.5 M NaHCO₃. 0.75 mg of Biotin-OSu N-
20 Hydroxysuccinimido-Biotin (Biotin-OSu, Sigma, Cat. # H1759, from a solution of 5 mg in 200 µl DMSO) were added to the antibody solution and incubated for two hours at room temperature with gentle shaking, followed by an overnight incubation at 2-8°C. The reaction solution was loaded onto a Sephadex G-25M (Pharmacia Cat. #17-0851-01) PD10 column to separate between the biotinylated
25 Mabs and the excess of non-reacted biotin-OSu.

The first preliminary experiments indicated that Mabs 29.08 and 30 produced the highest signal above background, when used as second antibodies in the ELISA.

The reaction of these two clones was tested again as second antibodies
30 with antibodies 12, 28, 29.08 and 50 used for coating of plates. The results of

this experiment clearly showed that Mab 28 was the antibody most suitable for coating.

The best results, in terms of signal intensity and specificity, were obtained with Mab 28 used for coating of the microtiter plate, and Mab 29.08, labelled with biotin, as a second antibody. Using these Mabs good results were obtained with all the three forms (+291, +292 and +331) of the r-hsLDLR. With all forms, the absorbency at 492/405nm was about 1.3 OD.

The three forms of the r-hsLDLR antigen were analysed in serial dilutions in a concentration range of 0.9-1000 ng/ml. A dose response curve was obtained with Mab 28 used for coating and biotinylated Mab 29.08 as a second antibody. This combination gave a linear response at a concentration range of 1-10ng/ml of r-hsLDLR.

The various parameters that may affect the ELISA test such as concentration of reagents, incubation periods, selection of buffers and plates were optimised by testing the following parameters:

- ☐ Coating of microtiter plate wells with 5-10 µg/ml of Mab28 in PBS.
- ☐ Buffer composition:
 - a) PBS+ Tween 20
 - b) Tris+Ca⁺² + NaCl + Tween 20
- ☐ Blocking solutions:
 - a) 1% Gelatine in PBS, 0.05% Tween, 0.005% Thimerosal
 - b) 1% BSA in PBS, 0.05% Tween, 0.005% Thimerosal
 - c) 1% FBS in PBS, 0.05% Tween, 0.005% Thimerosal
 - d) 1% Milk in PBS, 0.05% Tween, 0.005% Thimerosal
 - e) I Block, Hy Pep and Hy Yeast
- ☐ Second Mab 29.08, labelled with biotin, at concentrations of 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10,000 equivalent to a concentration range of 10.74-0.537 µg/ml.

□ Extravidin concentrations: 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10.000 equivalent to a concentration range of 4-0.2µg/ml.

On the basis of these experiments the final procedure for the sandwich ELISA test described in Example 6 below was established.

5 Example 6 Establishment of a Sandwich ELISA for r-hsLDLR

A sandwich ELISA to the r-hsLDLR was established using Mabs 28 and 29.08. Briefly 96 wells plate were coated with 100 µl of a Protein G purified Mab 28 (5 µg/ml) overnight at 2-8°C or 3 hrs. at 37°C. The plates were then washed five times with PBS+0.05% Tween 20. The plates were incubated with 200 µl of blocking solution (PBS+1%BSA or Gelatin + 0.05% Tween 20 + Thimerosal 0.05% for one hr at 37°C or over night at 4°C and washed five times with PBS+0.05% Tween 20. 100 µl of samples or of calibration curve antigen (CHO +291 r-hsLDLR, 0.5-32 ng/ml diluted in blocking solution), were added to the wells and incubated for 90 min at 37°C, with shaking. The plates were then washed five times with PBS+0.05% Tween 20.

100 µl/well biotinylated Mab 29.08 (0.67 µg/ml) in blocking solution were added, and incubated with shaking for one hour at 37°C. The plates were washed five times with PBS+0.05% Tween 20. 100 µl of a commercial extravidin – peroxidase conjugate, (ExtraAvidin TM-Peroxidase BioMakor, Cat.# 0645-1) diluted 1:10,000 were added to the wells and incubated with shaking for one hour at 37°C. The plates were then washed five times with PBS+0.05% Tween 20. 125 µl of the abovementioned substrate solution were added to each well and incubated for about 10 minutes until the colour developed to the desired intensity. The reaction was stopped by adding 125 µl of 4N HCL. The absorbency in the 96 wells plates was read using an ELISA reader at 492 and 405 nm wavelengths and the results were calculated by the MultiCalc software of the PC computer linked to the ELISA reader.

Example 7 Monoclonal antibodies isotype

The monoclonal antibodies Ig isotype was determined using a commercial isotyping kit (PharMingen International) according to the manufacturer's assay procedure. Clones 12.6, 28, 29.8 and 30 were identified as IgG₁, whereas clone
5 50.30 was found to be of the IgM class.

Example 8 SDS-PAGE Western blot analysis

The +291 form of purified r-hsLDLR and the native LDLR purified from human urine were analysed by western blot analysis with the monoclonal antibodies developed to the r-hsLDLR. Briefly a 12% SDS Poly Acrylamide gel
10 was loaded with 100ng/lane of the CHO +291 form of r-hsLDLR, or native urinary hsLDLR or TBP-1 crude harvest (as negative control) under reducing conditions (40mM DTT). One lane was loaded with Low Molecular Weight Markers (LMW). This set of samples was run five times. The proteins separated
15 on the gels were transferred by electroelution to nitrocellulose membranes. The membranes were incubated in PBS containing 10% low-fat milk, 0.1% Tween 20, for 16 hr. The membranes were cut into strips and each strip was incubated for 2 hours at room temperature with one of the five selected Mabs : 12.6, 30, 50.30, 28 or 29.08 (ascitis fluid diluted 1:4000) .

Membrane strips were washed with PBS containing 0.1% Tween 20
20 (3x15 min) and incubated for one hour with the second antibody – goat anti-mouse conjugated to horseradish peroxidase-alkaline phosphatase (diluted 1:10.000, BioMakor) for 2 hours at room temperature.

The strips were washed with PBS containing 0.1% Tween 20 (3x15 min). The positive bands were detected by enhanced chemiluminescence (ECL,
25 Amersham).

Monoclonal antibodies #12.6 and #29.8 recognised both the urinary as well as the +291 form of the purified r-hsLDLR in western blot analysis (Figure 2). Mabs 28 and 30 recognised the +291 form of the purified r-hsLDLR.

Example 9 Inhibition of r-hsLDLR antiviral activity by monoclonal antibodies

Mabs which specifically reacted with r-hsLDLR were tested for their ability to block the antiviral activity of r-hsLDLR (+291 form) *in-vitro*, using a cytopathic effect (CPE) inhibition assay in a VSV/WISH system.

WISH cells (of human amnion origin) were cultured in MEM supplemented with 10% FBS and 4 mM glutamine in a 37°C, 5% CO₂ incubator. Exponentially growing cells were seeded in 96-well tissue culture plates, at a density of 40,000 cells/well twenty-four hours before initiation of the assay. Samples to be tested and the standard were diluted and dispensed into the cells' containing wells. VSV was immediately added to the wells, at a multiplicity of Infection (MOI) of 0.5 pfu/cell. The plates were incubated 16-18 hours at 37°C and were then washed with ethanol. The monolayer of surviving cells was viewed by Gram Crystal Violet stain. Quantitation of the cytopathic effect relative to the standard was performed by plotting the colour density versus standard concentration.

For analysing the neutralising effect of the antibodies, r-hsLDLR was pre-incubated for 30 min. at 37°C, with increasing concentrations of ascitis fluid of the Mab tested. These solutions were then added to cultures of WISH cells in 96 microtiter plates, followed by the addition of vesicular stomatitis virus (VSV). After 18 hours incubation, the VSV mediated cell lysis was determined by staining of the remaining cells with crystal violet. Semi-quantitation of the cytopathic effect relative to the standard was performed by plotting the colour intensity (determined by an ELISA reader) versus standard concentration.

The effect of the Mabs was tested with increasing concentrations of r-hsLDLR. As shown in Table 1 two Mabs (12.6 and 50.30) were found to display neutralising activity.

In the experiment shown in Table 1, the inhibitory effect of the two Mabs was tested at a 1:40 dilution of the ascitis fluids. At this dilution, Mab 12.6 displayed somewhat higher activity than to Mab 50.30. This may result from the

properties of the Mabs, as well as from differences in their concentration in the ascitis fluid.

The inhibitory effect of the Mabs could be overcome by increasing r-hsLDLR relative to Mabs concentration. In fact at r-hsLDLR concentrations of 62.5 U/ml, neither Mab had any effect on r-hsLDLR activity at the antibody concentration analysed.

Table 1: Inhibition of r-hsLDLR antiviral activity by clones 12.6 and 50.30[ⓐ].

VSV/Mab	LDLR Concentration (U/ml)			
	0	2.5	12.5	62.5
- VSV	1.5	1.2	1.6	1.5
+ VSV	(0.25)	1	7 (1.7)	1.7
+VSV +Clone 50.30	6 (0.4)	0.88	(1.25)	1.62
+ VSV +Clone 12.6	5 (0.5)	0.77	7 (0.7)	1.67

- 10 ⓐ Inhibition of r-hsLDLR antiviral activity against VSV mediated cell lysis of WISH cells. The inhibitory effect of the Mabs was determined at a 1:40 dilution of the ascitis fluid. The number of viable cells is represented in the table in OD values. Numbers in brackets represent a repetition performed at the 0 and 12.5 U/ml LDLR concentrations.

15

Inhibition of the antiviral activity of r-hsLDLR was determined using increasing concentrations of Mabs 12.6 and 50.30. Mab 12.6, inhibited the antiviral activity of r-hsLDLR, by ~60% at a 1:40 dilution (of the ascitis fluid) and by ~35% at a 1:20,500 dilution. Clone 50.30 inhibited r-hsLDLR activity by ~45% at the 1:40 dilution and by ~15% at 1:20,500 dilution.

20

The dose response curve, obtained with both Mabs, and the observation that their inhibitory effect was impaired by excess r-hsLDLR, suggest that the Mabs exert their effect by binding to r-hsLDLR.

Example 10 Inhibition of HCV replication by monoclonal antibodies

Mabs specific for r-hsLDLR were tested for their ability to inhibit HCV replication in human hepatocytes in primary culture. FT167 cell culture was derived from a 57 year old male patient requiring lobectomy resection for medical purposes (metastasis of a colon tumor, right lobe).

Primary cultures of human hepatocytes were prepared by the two steps collagenase perfusion method (Maurel P. Adv. Drug Del. Rev. 22:105-132 (1996), Pichard L. et al. Mol. Pharmacol. 41:1047-1055 (1992), Ferrini JB. Et al. Chem-Biol Interactions 107:31-45 (1997)). The viability of the cells before plating was determined using trypan blue exclusion test. Four million cells in 3ml of culture medium were placed into 60-mm plastic dishes precoated with collagen. The long-term serum-free culture medium consisted of Williams'E, supplemented as published (Lanford R. et al. In Vitro Cell Dev. Biol. 25:174-182 (1989)). This medium was subsequently renewed every 48 hours. Cultures were maintained at 37°C in a humid atmosphere of air and 5% carbon dioxide. Under these culture conditions, human hepatocytes retain their differentiated phenotype for at least 35 days (Ferrini JB. Et al. Chem-Biol Interactions 107:31-45 (1997)) and are sensitive to HCV Infection and permissive to the viral genome replication (Fournier C. et al. J. Gen Virol. 79:2367-2374 (1998)).

HCV-positive serum sample: A bank of human sera from patients tested anti-HCV antibody-positive by the EIA HCV 3.0 and Chiron RIBA HCV 3.0 SIA has been established. None of these patients was co-Infected with HBV or HIV. In each serum sample HCV RNA was quantitated by the Roche monitor and genotyped by a line probe assay (Inno-Lipa HCV II, Innogenetics). Serum samples were stored at -80°C, in small aliquots in order to avoid freezing-thawing cycles. In these experiments the sample S42 (genotype 1b; viral load: 410 000 copies/ml) was used.

For infection and subsequent treatments, hepatocyte cultures were transferred under sterile conditions to a P3-laboratory (high confinement for human-IFNectious micro-organisms). Three days after plating, when the cells had recovered from the traumatism of isolation, in vitro infection of hepatocytes was performed by an overnight incubation with 25µL of HCV-positive serum sample

(S42) in 3mL of medium. After infection, cells were washed three times with 3mL of fresh medium and the culture was continued under normal conditions in the long-term culture medium.

Cells were treated with 3 different Mabs against r-hsLDLR, Mab12.6, Mab28 and Mab29.8. Thirty minutes before infection, cells were exposed to 2 or 8µg/ml of the different Mabs. Then cells were infected as described above.

Control cultures were infected under similar conditions but in the absence of antiviral treatment. In parallel experiments, the same cultures were treated with 5000 U/mL IFNα, under similar conditions for comparison (IFNα strongly inhibits HCV replication in the cells ref). All treatments were carried out in duplicate.

At day 5 post-Infection, the medium was removed and the cultures washed 3 times with cold phosphate-buffered saline. RNA was purified from 4 x 10⁶ hepatocytes using a guanidinium isothiocyanate-acid phenol extraction procedure (Chomczynski PN. And Sacchi N. *Analyt. Biochem.* 162:156-159 (1987)). The precipitated RNA was dissolved in 50 µL of diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water and quantified. One µg of cellular RNA was analyzed in the strand-specific rTth RT-PCR assay.

To avoid possible contamination, the strand-specific RT-PCR assay was carried out sequentially using three different rooms: a pre-PCR room, a PCR room and a post-PCR room. RNA dissolved in 10 µl of DEPC-treated water was covered with mineral oil and heated at 95°C for 1 min. The temperature was lowered to 70°C and 10 µl of preheated cDNA reaction mixture was added. The temperature was then dropped to 60°C for 2 min for annealing and the cDNA reaction was performed for 20 min at 70°C using the rTth DNA polymerase (Perkin-Elmer). The temperature was maintained at 70°C while 40 µl of prewarmed buffer containing EGTA as chelator of Mn²⁺ was added to suppress the rTth RT activity. Reaction tubes were held at 70°C while 40 µl of prewarmed PCR mixture was added. The PCR conditions, performed on Gene Amp ® PCR-System 9600 (Perkin-Elmer), consisted of an initial cycle at 94°C for 1 min, 50 cycles at 94°C for 15 sec, 58°C for 30 sec, 72°C for 30 sec and a final extension step at 72 °C for 7 min. For positive strand HCV RNA assay, the nucleotide

sequence of the reverse primer P3 is: 5'-
TGG/ATGCACGGTCTACGAGACCTC-3'. (nt 342-320) and that of the forward
primer P4 is: 5'- CACTCCCCTGTGAGGAACT-3'. (nt: 38-56), (Laskus T. et al.
J. Gen. Virol. 78:2747-2750 (1997)). The same primers were used in reverse
5 order to detect the negative strand. One-tenth of the amplified product was
analyzed by gel electrophoresis on agarose (2%), followed by coloration with
BET and photography under UV light. In all series of experiments, dilutions of
synthetic HCV RNA (+) and (-) strands were made and 1µg of total liver RNA
was added to mimic the conditions for analysis of cultured hepatocytes. These
10 mixtures were used as positive controls for RT-PCR assay and analysis.

Figure 3 shows that the production of the HCV negative strand, in the
presence of the Mabs against LDLr, was fully inhibited in culture FT167.
Therefore the replication of the viral genome was strongly inhibited. The results
were consistent with the view that the LDLR might be a receptor for HCV.

15

Example 11 Production of chimeric antibodies to LDLR

mRNA is purified from a hybridoma line producing mAb specific for
LDLR.

Specific cDNA is synthesized with oligonucleotides complementary to
20 the 5' end of the exon CH1 from the heavy chain variable domain (oligo 1) and
from the 5' of the C μ hexon of the light chain variable domain (oligo 2) using the
purified mRNA as the template.

Two cDNAs are obtained one of which encode the variable region
(specific for LDLR) of the heavy chain, and the other the variable region (specific
25 for the LDLR) of the light chain. The cDNAs are cloned and sequenced.

For the construction of the chimeric heavy chain, the variable region of a
cloned human Ig heavy chain gene is exchanged (using genetic manipulations)
for the cloned DNA encoding the mouse variable domain (specific for LDLR) of
the heavy chain. The genetic manipulations include excision of the variable
30 region from the human Ig, using specific restriction enzymes and ligation of the
mouse variable region. The same procedure is performed to obtain the chimeric
light chain.

Two mammalian expression plasmids are constructed, one including the chimeric heavy chain gene and the other including the chimeric light chain gene. Both vectors are used to cotransfect the hybridoma cell line (SP6).

The production of LDLR specific Ig is tested by ELISA or western blots using culture soup of transfectant cells as secondary antibody. The affinity of the chimeric antibody to its ligand is monitored by Biacore.

Example 12 Preparation of transgenic mice that are engineered to contain human immunoglobulin gene loci (xenomice) and preparation of human mAb against hLDLR.

Xenomice preparation is described in WO 98/24893 and Mendez M.J. et al Nature genetics 15:146-56(1997).

Human-yeast artificial chromosome (YAC) libraries are screened for YACs containing the human heavy chain variable region (about 1000 kb) (YAC cloning method is the method of choice when inserts sizes bigger of 100 kb are required).

The YACs are characterized by Southern blot analysis and by Pulse Field Electrophoresis (PFGE). The YACs should include the C μ C δ , Dh and Vh regions in germ line configuration.

Through utilization of the overlapping sequences contained in the YACs, the YACs are recombined in yeast by stepwise recombination strategy. Prior to recombination the 3' end YAC (with the V region) is ligated to HPRT selectable marker. The structure of recombined YAC is confirmed by PFGE and Southern blot analysis (presence of the human heavy chain locus from C region to Vh region in germline configuration).

The YAC acentric arm is targeted with a vector bearing the complete γ 2 constant region, mouse enhancer, neomycin resistance gene, to yield the final heavy chain containing the whole variable region i.e. 82 Vh genes, 6 Jh genes and 3 different constant regions C μ C δ C γ with their corresponding regulatory sequences. This YAC is designated yH2. This construct is used for the production of the Xenomouse.

A similar strategy to the one used above is utilized for the reconstruction of the kappa loci, only that: neomycin selection marker is ligated to the

reconstructed YAC containing the whole kappa loci. This YAC is designated yK2.

YACs containing the yH2 are introduced into ES cell via fusion of YAC containing yeast spheroplast with HPRT deficient E14.TG3B mouse ES cells.

- 5 HPRT positive cells are selected. Positive clones are propagated and analyzed by Southern blots and by CHEF blot analysis. Clones containing the intact yH2 YAC are selected.

Introduction and selection of yK2 YAC in ES cells is performed similarly as described for yH2 YAC.

- 10 YH2 containing ES cells are microinjected into mouse C57BL/6J blastocytes. The chimeric males produced are evaluated for germ line transmission to offspring.

- yH2 and or yK2-transgenic mice are bred with DI mice (homozygous for gene targeted-inactivated mouse heavy and kappa chain loci). Each of the yH2;DI
15 transgenic strains are bred with yK2;DI transgenic strain to generate Xenomouse strains.

Reconstitution of B-cell development and antibody production in Xenomouse is evaluated by flow cytometry and ELISA.

The immunization of xenomouse is performed as described in example 2.

- 20 The methods for the hybridoma preparation and screening of positive clones are similar to those described in examples 3 and 4.

- Hybridoma clones 12.6, 28, 29.8, 30 and 50.30 were deposited at the Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, Paris, under the Budapest Treaty and were accorded deposit Nos. I-2390, I-2391,
25 I-2392, I-2393 and I-2394, respectively.

REFERENCES

- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q. X. (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor [In Process Citation]." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22), 12766-71.
- Beisiegel, U., Schneider, W. J., Goldstein, J. L., Anderson, R. G., and Brown, M. S. (1981). "Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probes for study of receptor-mediated endocytosis and the genetics of familial hypercholesterolemia." *J Biol Chem*, 256(22), 11923-31.
- Bieri, S., Djordjevic, J. T., Daly, N. L., Smith, R., and Kroon, P. A. (1995). "Disulfide bridges of a cysteine-rich repeat of the LDL receptor ligand-binding domain." *Biochemistry*, 34(40), 13059-65.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1976). "Familial hypercholesterolemia: A genetic defect in the low-density lipoprotein receptor." *N Engl J Med*, 294(25), 1386-90.
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." *Science*, 232(4746), 34-47.
- Chomczynski, P.N., And Sacchi, N. (1987). "Single -step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Analyt. Biochem.* 162:156-9.
- Eshhar Z, 1985 "Monoclonal Antibody Strategy and Techniques" in "Hybridoma technology in the bioscience and medicine", Edited by Timothy A. Springer (Plenum Publishing Corporation, 1985; Chapter 1)
- Fischer, D. G., Tal, N., Novick, D., Barak, S., and Rubinstein, M. (1993). "An antiviral soluble form of the LDL receptor induced by interferon". *Science*, 262(5131), 250-3.
- Fischer, D.G., Novick, D., Cohen, B, Rubinstein, M. (1994). "Isolation and characterization of a soluble form of the LDL receptor, an interferon-induced antiviral protein". *Proc Soc Exp Biol Med* 206(3),228-32.
- Ferrini, J.B., Pichard,L.,Domergue, J., and Maurel, P. (1997). "Long-term primary cultures of adult human hepatocytes". *Chem-Biol Interactions* 107:31-45.
- Fournier, C., Sureau, C., Coste, J., Ducos, J., Pageaux, G., Larrey, D., Domergue, J., and Maurel, P. (1998). " In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus". *J. Gen Virol.* 79:2367-74.
- Goldstein, J. L., Anderson, R. G., and Brown, M. S. (1979). "Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis." *Nature*, 279(5715), 679-85.
- Goldstein, J. L., Dana, S. E., Brunschede, G. Y., and Brown, M. S. (1975). "Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia: evidence for two

- different mutations affecting functions of low-density lipoprotein receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(3), 1092-6.
- Lanford R.E., Carey, K.D., Estlack, L.E., Smith, G.C., and Hay, R.V. (1989)
5 "Analysis of plasma protein and lipoprotein synthesis in long-term primary cultures of baboon hepatocytes maintained in serum-free medium" *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25:174-82.
- Laskus T., Radkowski, M., Wang, L.F., Cianciara, J., Vargas, H., and Rakela, J. (1997). "Hepatitis C virus negative strand RNA is not detected in peripheral blood mononuclear cells and viral sequences are identical to those in serum: a
10 case against extrahepatic replication". *J. Gen. Virol.* 78:2747-50.
- Maurel P. (1996) "The use of adult human hepatocytes in primary culture and other in vitro systems to investigate drug metabolism in man". *Adv. Drug Del. Rev.* 22:105-132
- Mendez, M.M., Green, L.L., Corvalan, J.R.F., Jia X-C., Maynard-Currie, E.E.,
15 Yang, X-D., Gallo, M.L., Louie, D.M., Lee, D.V., Erickson, K.L., Luna, J., Roy, C.M-N., Abderrahim, H., Kirshenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D.M., Fukushima, A., Hales, J.F., Finer, M.H., Davis, C.G., Zsebo, K.M. and Jakobovits, A. (1997). "Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice". *Nature Genetics*, 15, 146-56.
20
- Pichard, L., Fabre, I., Daujat, M., Domergue, J., Joyeux, H., and Maurel, P. (1992). "Effect of corticosteroids on the expression of cytochromes P450 and on cyclosporin A oxidase activity in primary cultures of human hepatocytes". *Mol. Pharmacol.* 41:1047-55.
- Riachmann, L., Clark, M., Waldmann, H., and Winter, G. (1988). "Reshaping human antibodies for therapy." *Nature*, 332, 323-27.
25
- Sudhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Russell, D. W. (1985). "The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins." *Science*, 228(4701), 815-22.
- Urlaub, G. and Chasin, L.A. (1980) Isolation of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient in Dihydrofolate Reductase Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220.
30

CLAIMS

1. A monoclonal antibody, chimeric antibody, fully humanized antibody,
5 anti-anti-ID antibody or fragment thereof which specifically recognizes
and binds human LDL receptor and fragments thereof, except monoclonal
antibody C7.
2. A monoclonal antibody according to claim 1 which specifically recognizes
and binds the human soluble LDL receptor.
- 10 3. A monoclonal antibody according to claim 1, being the Mab expressed by
hybridoma clone 12.6 deposited at the CNCM under No. I-2390.
4. A monoclonal antibody according to claim 1, being the Mab expressed by
hybridoma clone 28 deposited at the CNCM under No. I-1291.
5. A monoclonal antibody according to claim 1, being the Mab expressed by
15 hybridoma clone 29.8 deposited at the CNCM under No. I-2392.
6. A monoclonal antibody according to claim 1, being the Mab expressed by
hybridoma clone 30 deposited at the CNCM under No. I-2393.
7. A monoclonal antibody according to claim 1, being the Mab expressed by
hybridoma clone 50.30 deposited at the CNCM under No. I-2393.
- 20 8. Monoclonal antibodies according to any one of claim 3-7 the belong to the
immunoglobulin isotype IgG₁ or IgM.
9. A method for the detection and/or the quantitation of human LDLR which
comprises the use of a monoclonal antibody according to any one of the
preceding claims.
- 25 10. Monoclonal antibodies according to claim 1 capable of being used as a
pair in an ELISA.
11. Monoclonal antibodies according to claim 10 being monoclonal antibodies
generated by hybridoma clone 28 or clone 29.8.
12. Monoclonal antibodies according to claim 1 capable of identifying LDLR
30 in Western Blot analysis.

13. Monoclonal antibodies according to claim 12 being monoclonal antibodies generated by hybridoma clone 12.6, clone 28, clone 29.8, or clone 30.
14. Monoclonal antibodies according to claim 1 capable of neutralizing the antiviral biological activity of r-hsLDLR.
- 5 15. Monoclonal antibodies according to claim 14 being monoclonal antibodies generated by hybridoma clone 12.6 or clone 50.30.
16. Monoclonal antibodies according to claim 1 capable of inhibiting the replication of hepatitis c virus.
- 10 17. Monoclonal antibodies according to claim 16 being monoclonal antibodies generated by hybridoma clone 12.6, clone 28 or clone 29.8.
18. The hybridoma clone 12.6 deposited at the CNCM under No. I-2390.
19. The hybridoma clone 28 deposited at the CNCM under No. I-2391.
20. The hybridoma clone 29.8 deposited at the CNCM under No. I-2392.
21. The hybridoma clone 30 deposited at the CNCM under No. I-2393.
- 15 22. The hybridoma clone 50.30 deposited at the CNCM under No. I-2393.
23. A method for preparing a monoclonal antibody according to claim 1, comprising growing a cloned hybridoma comprising a spleen cell from a mammal immunized with hsLDL and a homogenic or heterogenic lymphoid cell in liquid medium or mammalian abdomen to allow the
20 hybridoma to produce and accumulate the monoclonal antibody.
24. A method according to claim 21 wherein the LDLR immunogen is highly purified human LDLR.
25. A method for purifying human LDLR which comprises contacting a
25 material containing human LDLR with a monoclonal antibody according to any one of claims 1-8.

ABSTRACT

- 5 There are provided monoclonal antibodies to the LDL receptor which are useful for the identification and purification of LDL and in treatment of e.g. hepatitis C infection.

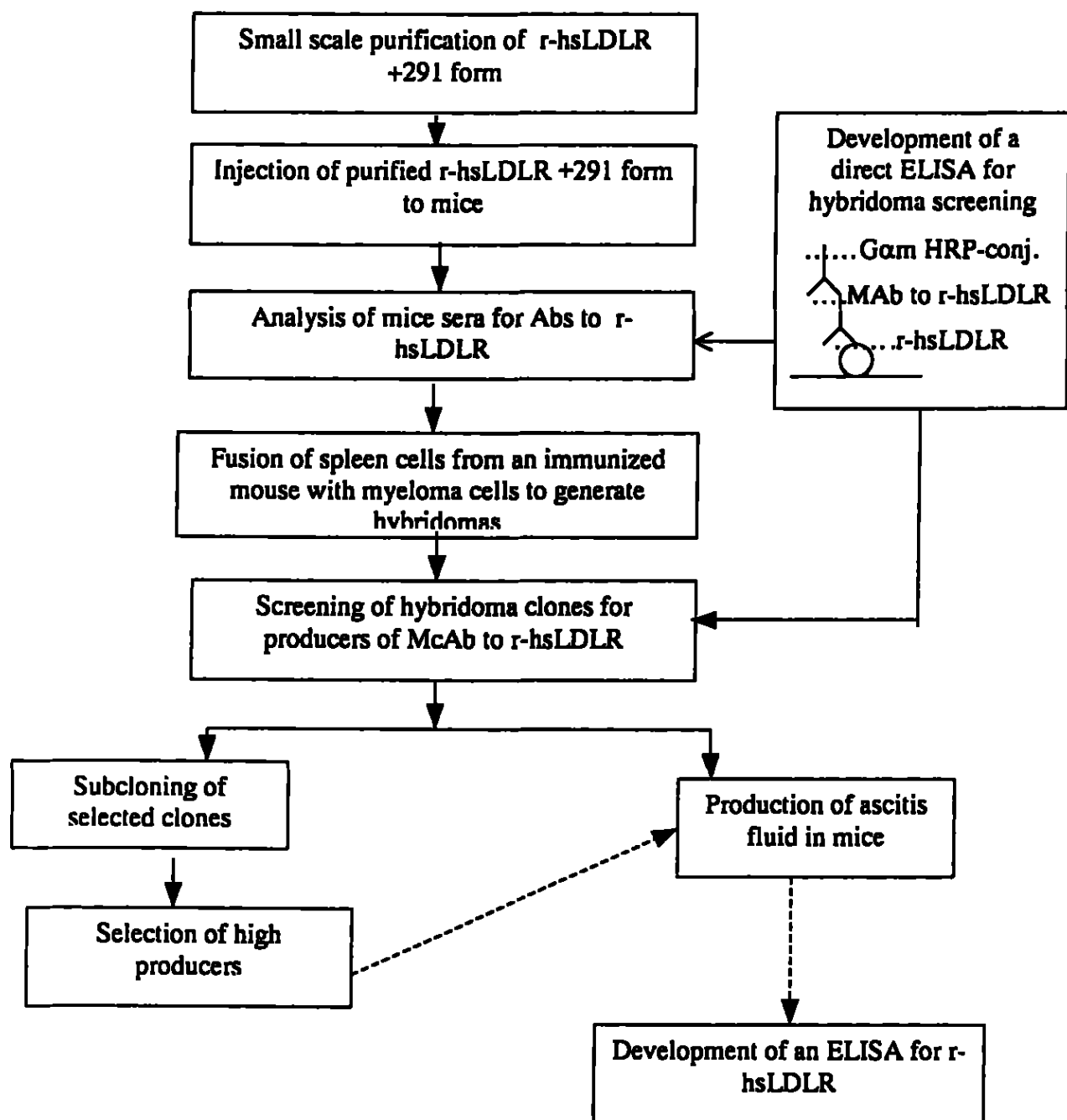


Figure 1

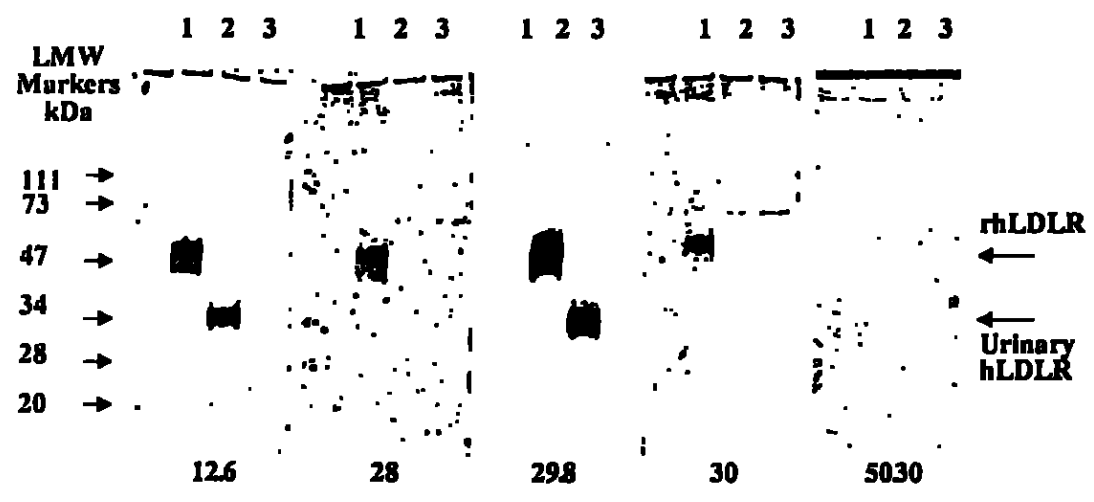


Figure 2

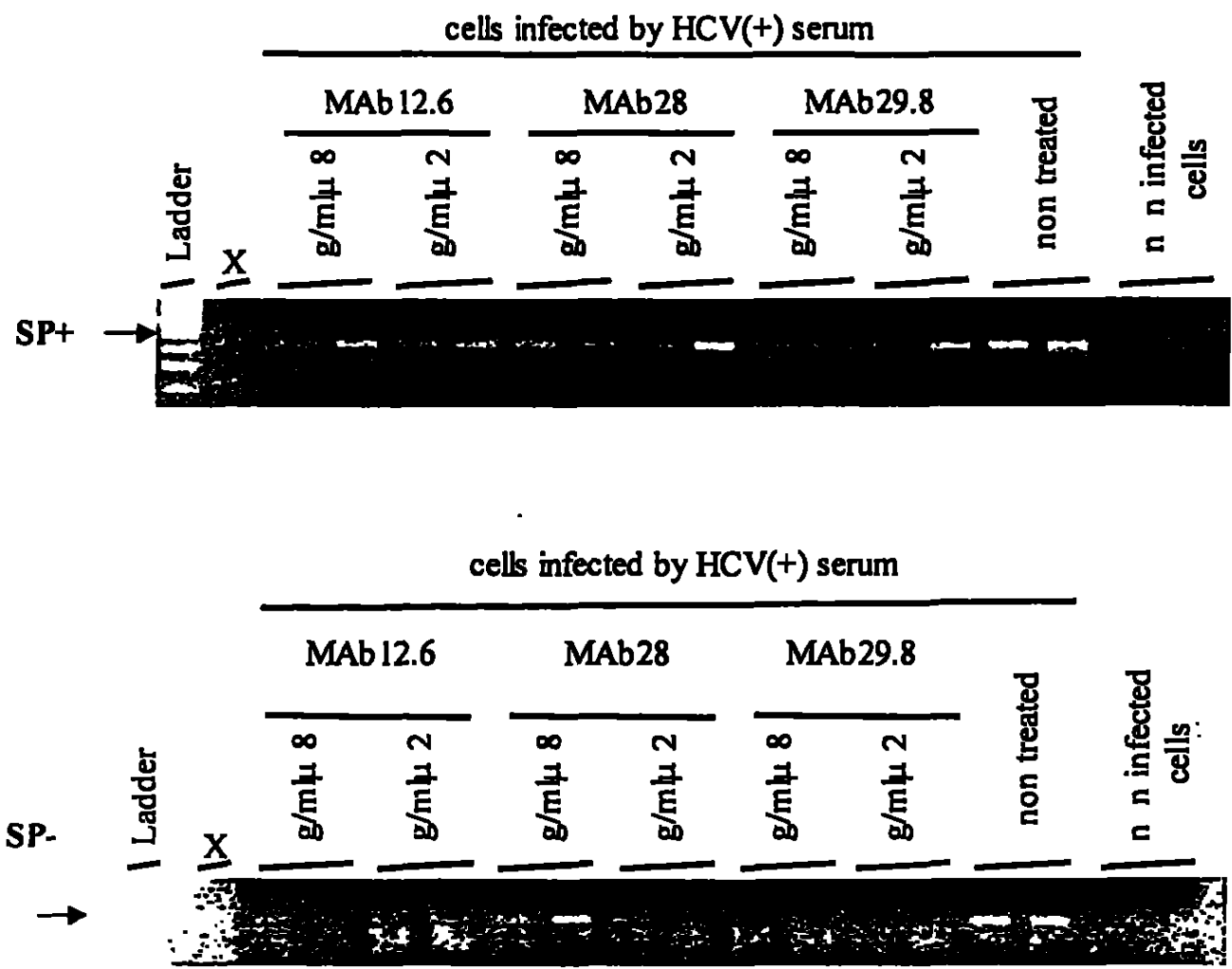


Figure 3

ANTICUERPOS MONOCLONALES AL RECEPTOR LDL HUMANO, SU PRODUCCIÓN Y USO

--

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente el receptor humano para lipoproteínas de baja densidad (LDLR). Estos Anticuerpos son útiles por ejemplo para la identificación y purificación de LDLR humano soluble (hsLDLR) en procesos de producción así como también en la identificación y tratamiento de enfermedades tales como la infección de hepatitis C (HCV).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El colesterol, un componente de todas las membranas de plasma eucarióticas es esencial para el crecimiento y la viabilidad de células en organismos superiores. Sin embargo, altos sero niveles de colesterol originan enfermedad y muerte al contribuir a la formación de placas ateroscleróticas en las arterias en todo el cuerpo. El mayor sitio de síntesis de colesterol en mamíferos es el hígado. Cantidades apreciables de

colesterol también se forman en el intestino. La proporción de formación de colesterol en estos órganos responde altamente a la cantidad de colesterol absorbida de las fuentes de dieta. Las células exteriores del hígado y el intestino adquieren el colesterol del plasma en lugar de sintetizarlo de novo. El colesterol y otros lípidos son transportados en fluidos del cuerpo mediante lipoproteínas, que son clasificadas de acuerdo con densidad creciente. Una lipoproteína es una partícula que consiste de un núcleo de lípidos hidrofóbicos rodeada mediante una cubierta de lípidos polares y apoproteínas. Estas lipoproteínas tienen dos papeles: ellas solubilizan lípidos altamente hidrofóbicos y ellas contienen señales que regulan el movimiento de lípidos particulares dentro y fuera de células objetivo específicas y tejidos. El colesterol se transporta en fluidos del cuerpo mediante lipoproteínas de baja densidad (LDL) que se unen a un receptor específico sobre la membrana del plasma de células no hepáticas. El complejo receptor -LDL se internaliza entonces en las células mediante un mecanismo de transporte conocido como endocitosis mediada por receptor (Goldstein et al). (1979. El receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL) es el prototipo de una familia de receptores de superficie celular

estructuralmente relacionadas que median la endocitosis de múltiples ligandos en células de mamíferos.

El receptor LDL consiste de 822 residuos de aminoácido y exhibe un peso molecular de 164000. Este se compone de varios dominios algunos de los cuales comparten homología de secuencia con otras proteínas. Su dominio de ligando-unión NH_2 -terminal consiste de 292 residuos, dispuestos en 7 repeticiones imperfectas ricas en cisteína. Cada repetición contiene 6 residuos de cisteína que están ligadas al disulfuro en el patrón uno a tres, dos a cinco y cuatro a seis (Bieri et al. 1995). Este dominio es seguido por cuatro dominios adicionales: el primero consiste de 400 residuos de aminoácido y es homólogo al receptor EGF, el segundo consiste de 58 residuos de aminoácidos ricos en azúcares O-ligados, el tercero es un dominio de transmembrana simple de 22 residuos de aminoácido y el cuarto es un dominio citoplasmático de 50 residuos de aminoácido (Sudhof et al. 1985), (Brown et al. 1986).

La importancia fisiológica del receptor LDL fue revelada por los estudios de Brown y Goldsteins sobre hipercolesterolemia familiar (FH). La enfermedad se

encontró que era debida a un defecto genético molecular que resultaba en la ausencia o deficiencia de receptores funcionales para el LDL (Brown et al.1976). Varias clases de mutaciones FH se han caracterizado. (Goldstein et al. 1975).

Una forma soluble del sLDLR que exhibe actividad antiviral se identificó y aisló de un cultivo supernadante de células inducidas por interferón (Fischer et al. 1993) y en fluidos del cuerpo (Fischer et al. 1994). Se han identificado varias proteínas inducidas por interferón que son instrumentales en la inducción del estado antiviral de la IFN. Una de tales proteínas que exhibe actividad antiviral se produjo y acumuló en el cultivo supernadante de células WISH amnios de humano. Esta proteína se purificó hasta homogeneidad y se identificó como el sLDLR (ver EP 0 553 667 y Fischer et al. 1993). El sLDLR se encontró que era secretado en el medio por células de mamíferos que entraban en estado antiviral e respuesta al interferón. Como contraste al interferón, el sLDLR no induce un estado antiviral en las células sino es antiviral e sí mismo. Se encontró que el sLDLR aparentemente tenía que estar presente a lo largo del proceso de maduración de replicación viral y la

gemación que lo sugería podía estar involucrada en un proceso complejo que conduce a la inhibición del ensamblaje del virus o gemación (datos no publicados). La endocitosis del virus de la hepatitis C ha sido mostrada recientemente por ser mediada por receptores LDL en células de cultivo (Agnelo et al. 1999). Estos y otros hallazgos sugieren que la familia de los receptores LDL pueden servir como receptores virales. Por lo tanto, los anticuerpos que han surgido contra el receptor sLDLR podrían bloquear la entrada y gemación de partículas virales al ligarse al receptor LDL celular. El único anticuerpo monoclonal disponible al LDLR conocido hasta ahora es el C7, un anticuerpo de LDLR bovino (Beisiegel et al. 1981), comercialmente disponible de Amersham, RU) que se preparó mediante inmunización de ratones con el cortex adrenal de bovino LDLR purificado hasta homogeneidad. Las membranas del cortex adrenal de bovino fueron solubilizadas y el receptor fue parcialmente purificado mediante elución de una columna de DEAE-celulosa (Beisiegel et al). 1981. El anticuerpo para el LDLR de bovino solo reacciona en cruce débilmente con el LDLR de humano.

De hecho, el Mab C7 al LDLR de bovino se encontró que tenía desventajas significativas cuando se utilizaba para la detección y cuantificación de LDLR recombinante humano:

- a) tenía muy poca afinidad con LDLR de humano
- b) este reacciona en cruce significativamente con impurezas derivadas de cultivos de células.

Los anticuerpos específicos al LDLR de humano no estaban previamente disponibles. Esto parecía sorprendente en razón de que es muy común que surjan anticuerpos contra proteínas novedosas, lo sea para purificación identificación o para propósitos de desarrollo de ensayo. Es posible que tales anticuerpos no hallan sido generados hasta ahora, en razón de que una condición para generar anticuerpos monoclonales es la disponibilidad de cantidades suficientemente grandes de antígeno altamente purificado que permitan la inmunización eficiente de ratones. Un antígeno altamente purificado es aquel que aparece como un pico simple mayor en el RP-HPLC. Métodos adicionales para identificación y cuantificación del antígeno durante los procesos de

purificación no fueron fáciles de establecer. De acuerdo con la invención, el ensayo de actividad antiviral descrito aquí se empleo para la identificación del LDLR durante procesos de purificación.

Existe necesidad de generar Mab específicos para el LDLR solubles de humanos para proporcionar los medios para desarrollar un inmuno ensayo deficiente (ELISA) y para la identificación de la proteína en "Western blot". Estos anticuerpos se requieren para el monitoreo y cuantificación de LDLR recombinante soluble de humano durante el desarrollo de la producción y el proceso de purificación de la proteína recombinante y para la detección de la proteína natural.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención permite la generación de líneas de células hibridoma que producen anticuerpos monoclonales capaces de reconocer específicamente y de ligarse al receptor LDL de humano y a fragmentos de este.

Más específicamente la presente invención permite la generación de líneas de células hibridoma que producen

anticuerpos monoclonales capaces de reconocer específicamente y de ligarse a receptores LDL solubles de humano.

Así, la presente invención se relaciona con un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, anticuerpo anti-Id o fragmento de este que reconoce específicamente y se liga al receptor ALDL de humano y fragmentos de este, excepto anticuerpos monoclonales C7.

La presente invención suministra tales anticuerpos monoclonales que reconocen y se ligan al LDLR soluble de humano y satisfacen las siguientes necesidades:

1. Los Mab que se pueden utilizar como un par en un ELISA, por ejemplo un emparejado ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para la detección de LDLR soluble de humano.
2. Los Mab que se pueden utilizar para la identificación del LDLR en análisis "Western Blot".
3. Los Mab que se pueden utilizar para neutralizar la actividad biológica antiviral del LDLR soluble de humano.

4. Los Mab que se pueden utilizar para inhibir la infección de virus, tales como el HCV.

La presente invención proporciona además un método para la detección y/o la cuantificación del LDLR de humano que comprende el uso de anticuerpos monoclonales específicos de acuerdo con la invención de una manera conocida para aquel propósito.

La presente invención también suministra hibridoma clonado que comprende una célula de vaso proveniente de un mamífero inmunizado con LDLR recombinante de humano y una célula linfoide homogénica y heterogénica.

Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención se prepara de una manera convencional, por ejemplo, al hacer crecer un hibridoma clonado que comprende una célula de vaso proveniente de un mamífero inmunizado con hsLDL y una célula linfoide homogénica o heterogénica en un medio líquido o en abdomen de mamífero para permitirle al hibridoma producir y acumular el anticuerpo monoclonal.

La invención, aún en otro aspecto, suministra un método para purificar el LDLR de humano que comprende poner en contacto en un material que contiene LDLR crudo con un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención. Una columna con anticuerpo monoclonal específico LDLR se puede utilizar como una etapa de purificación de afinidad, en el proceso de purificación de la proteína recombinante.

Un método para detectar y medir el LDLR humano recombinante que comprende el utilizar como anticuerpo los anticuerpos monoclonales de la presente invención en un ensayo ELISA como se describe en el ejemplo 5.

Como el LDLR o fragmento de un LDLR para inmunizar animales cualquier LDLR se puede utilizar mientras que este sea el LDLR de un mamífero de sangre caliente. Una muteína de LDLR también se puede utilizar. Un ejemplo representativo de tal LDLR soluble de humano mamífero es la forma soluble de LDLR + 291 que incluye la secuencia de aminoácido que inicia en el aminoácido Asp en la posición +4 y finaliza con el aminoácido Glu en la posición +291 de la secuencia del LDLR de humano,

cualquier otra forma se puede también utilizar tal como la forma +292 etc.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra un diagrama de flujo que describe el desarrollo de anticuerpos monoclonales al r-hsLDLR .

La figura 2 muestra un análisis "Western blot" de la forma +291 del r-hsLDLR en el carril 1, el hsLDLR urinario en el carril 2 y el receptor p55 TNF recombinante de humano como un control negativo (r-hTBP-1) en el carril 3, con los anticuerpos monoclonales indicados inmediatamente debajo de cada una de las tiras. Las flechas a la izquierda de la figura indican la posición de los marcadores de peso molecular y las flechas a la derecha de la figura puntualizan la posición de la forma hsLDLR indicadas por encima de cada flecha.

La figura 3 muestra el efecto de los Mab 12.6, 28 y 29.8 sobre la producción de hebras HCV(+) y (-) en cultivo FT167. Las células fueron tratadas 30 minutos

antes de la infección con Mab anti-LDLR (8 o 2 µg /ml). Luego, las células se infectaron durante toda la noche con 25 µl de suero HCV (+) (No.42; 1b). El día después de la infección, se hicieron tres lavados y se agregó nuevo medio y se cargó cada 48 horas. Cinco días después de la infección, los hepatocitos fueron cosechados, se purificó el ARN y se analizó un µg de ARN celular mediante rTth RT-PCR (Perkin Elmer). Los ensayos se desarrollaron por duplicado.

+SP: ensayo de ARN de hebra positiva; -SP: ensayo de ARN de hebra negativa; X: blanco.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se generaron anticuerpos monoclonales (Mab) al LDLR soluble de humano (hsLDLR). Utilizando Estos anticuerpos monoclonales, se desarrollaron procedimientos ELISA y un "Western Blotting" para la identificación del hsLDLR y un ensayo de neutralización a la actividad antiviral del hsLDLR.

Los Mab se generaron en ratones, inmunizados con la forma recombinante +291 del hsLDLR, que consiste del dominio de unión desligando N-terminal del LDLR soluble de humano, desde el Asp +4 al Glu +291. La forma +291 recombinante del hsLDLR, se produjo en células CHO y se purificó hasta homogeneidad.

Los ratones inmunizados produjeron títulos significativos de anticuerpos específicos. Después del tamizado de hibridomas, se identificaron cinco clones (números 12, 28, 29, 30 y 50) como los mayores productores de anticuerpos. Estos clones fueron seleccionados para su clonación adicional. Después de la subclonación, 29 subclones que tenían alta productividad anticuerpo se aislaron y se congelaron ampollas de los clones padres y de los clones.

Un par de anticuerpos monoclonales se escogió para el ELISA al r- hsdldr. El Mab 28 se seleccionó como el anticuerpo de recubrimiento, y el Mab 29.8, etiquetado con biotina, se escogió como el segundo anticuerpo. Los Mab 12.6 y 29.8 se encontraron como adecuados para la identificación del hsLDLR

Nativo y recombinante en análisis "Western blot" y los Mab 28 y 30 se encontraron como adecuados para la identificación del hsLDLR recombinante en análisis "Western blot". Los Mab 12.6 y 50.30 se encontraron adecuados para la inhibición de la actividad antiviral del hsLDLR.

También se encontró de acuerdo con la invención que los Mab 12.6, 28 y 29.8 inhiben la replicación del genoma viral del virus de la hepatitis C (HCV) en cultivos primarios de hepatocitos de humano. Así, estos anticuerpos se pueden utilizar para el tratamiento de infección de hepatitis C (figura 3).

Se determinó el isotipo subclase del Mab producido mediante los clones. Los clones 12.6, 28, 29.8 y 30 se identificaron como IgG₁ mientras que el clon 50.30 se encontró que era el IgM.

Los Mab, desarrollados contra la forma +291 del hsLDLR también reconocieron otras formas del hsLDLR, es decir la forma +292 y la forma +331 del r- hsLDLR producida en células CHO recombinantes en análisis ELISA y en "Western blot". La forma +292 comprende la parte N-

terminal del receptor del residuo de aminoácido Asp +4 al Cys +292 y la forma +331 comprende la parte N-terminal del receptor desde el residuo aminoácido Asp +4 Cys +331.

El antígeno utilizado para inmunizar ratones para generar anticuerpos monoclonales fue la forma r- hsLDLR +291, que fue producida en células CHO. La producción del r- hsLDLR se desarrollo en biorreactores, utilizando el sistema matriz fibracel de fase estacionaria. El r- hsLDLR se purificó hasta homogeneidad y se utilizó para inmunización de ratones.

Las células de vaso inmunes provenientes del mejor ratón respondedor se utilizaron para fusión y generación de hibridomas.

Con relación a los anticuerpos mencionados aquí, el termino "anticuerpo monoclonal" significa la inclusión de anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanizados, anticuerpos hasta anticuerpos anti-idiotípicos (anticuerpos anti-anti-Id) que se pueden etiquetar en forma soluble o ligada, así como también fragmentos de estos suministrados mediante una técnica conocida, tal como, pero no limitada a

escisión enzimática, síntesis de péptidos o técnicas recombinantes.

Un anticuerpo monoclonal contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos a antígenos, cuya población contiene sustancialmente sitios de unión de epitope pesimelares. Los Mab se pueden obtener mediante métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo kohler y Milstein, Nature, 256: 495-497 (1975), patente estadounidense No. 4,376,110; Ausubel et al. ., ed., Harlow y Lane ANTIBOIDS: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); y Colligan et al., ed., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. And Wiley Interscience N.Y., (1992-1996), cuyos contenidos se incorporan completamente aquí como referencia. Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquiera de las clases de estas. Un hibridoma que produce un Mab de la presente invención se puede cultivar in Vitro, in situ o in vivo. La producción de altos titulados de Mab in vivo o in situ hacen de este el método actualmente preferido de producción.

Los anticuerpos quiméricos son moléculas de las cuales se derivan diferentes porciones de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un Mab de murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos son primariamente utilizados para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para incrementar el rendimiento en la producción por ejemplo, cuando los Mab de murino tienen rendimientos más altos de los hibridomas pero mayor inmunogenicidad en humanos, de tal forma que se utilizan Mab quimérico de humano/murino. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (Cabilly et al., Proc. Natu.Acad.Sci.USA 81: 3273-3277 (1984); Morrison et al., Proc. Natu. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984); Boulianne et al., Nature 312: 643-646 (1984); Cabilly et al., solicitud de patente europea 125023 publicada noviembre 14, (1984); Neuberger et al., nature 314:268-270 (1985); Taniguchi et al., solicitud de patente europea 171496 (publicada febrero 19, 1985); Morrison et al., solicitud de patente europea 173494 (publicada marzo 5, 1986); Neuberger et al., solicitud PCT WO 8601533, (publicada marzo 13, 1986) Kudo et al., solicitud de patente europea 184187 (publicada junio 11, 1986);

Sahagan et al., J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson et al., solicitud de patente internacional No. WO8702671 (publicada mayo 7, 1987); Liu et al., Proc. Natu. Acad. Sci USA 84: 3439-3443 (1987); Sun et al., proc. Natu. Acad. Sci USA 84: 214-218 (1987); Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988) Riechmann et al., Nature 332: 323-327, y Harlow y Lane , ANTIBOIDES: A LABORATORY MANUAL, supra. Estas referencias se incorporan completamente aquí como referencia.

Los "anticuerpos completamente humanizados" son moléculas que contienen tanto la región variable como la constante de la inmunoglobulina humana. Los anticuerpos completamente inmunizados pueden ser potencialmente utilizados para uso terapéutico, donde los tratamientos repetitivos se requieren para enfermedades crónicas y recurrentes tales como las enfermedades autoinmunes. Un método para la preparación de anticuerpos completamente humanos consiste de la "humanización" del sistema inmuno humoral del ratón, es decir, la producción de hebras de ratón capaces de producir Ig humano (xenoratonos), mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana (Ig) dentro de los ratones en los cuales los genes Ig endógenos se han inactivado. Los loci Ig son

exageradamente complejos en términos tanto de su estructura física como del rearreglo genético y el proceso de expresión requerido para producir finalmente una respuesta auto inmune amplia. La diversidad de los anticuerpos es principalmente generada por rearreglos combinatorios entre diferentes genes V, D y J en el loci Ig. Estos loci también contienen elementos regulatorios entre mezclados que controlan la expresión del anticuerpo, la exclusión alélica, la conmutación de clase y la maduración de afinidad. La introducción de transgenes Ig humanos sin rearreglo en ratones ha demostrado que la maquinaria de recombinación del ratón es compatible con los genes humanos. Adicionalmente, los hibridomas que secretan antígeno específico hu-mAb de varios isótopos se pueden obtener mediante inmunización de Xenoratonos con antígeno.

Los anticuerpos completamente humanizados y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156 (1997); Buggermann et al., Eur. J . i nmunol. 21: 1323-1326 (1991); Tomizuka et al., Proc. Natu. Acad. Sci. USA 97: 722-727 (2000) patente WO 98/24893.

Un anticuerpo anti idiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio antígeno-ligante de un anticuerpo. Un anticuerpo Id puede ser preparado al inmunizar un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo sepa de ratón) como la fuente del Mab para la cual esta siendo preparado un anti-Id. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante al producir un anticuerpo de estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Ver, por ejemplo, patente estadounidense N0. 4,699,880, que se incorpora aquí totalmente como referencia. El anticuerpo anti-Id se puede utilizar como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune a un en otro animal, produciendo un así llamado anticuerpo anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al Mab original, el cual indujo el anti-Id. De esta forma, al utilizar anticuerpos a los determinantes ideo típicos del Mab es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica.

De acuerdo con esto, los Mab generados contra el LDRL, sus isoformas, análogos, fragmentos o derivados de la presente invención se pueden utilizar para inducir

anticuerpos anti-Id en mamíferos adecuados, tales como el ratón BALB/c. Las células de vaso provenientes de tales ratones inmunizados son utilizadas para producir hibridomas anti-Id que secretan Mab anti-Id. Adicionalmente, los Mab anti-Id se pueden acoplar a un portador tal como la hemocianina de limpeto ojo de llave (KLH) y utilizarla para inmunizar ratones BALB/c adicionales. El suero proveniente de estos ratones contendrá anticuerpos anti-anti-Id que tienen las propiedades ligantes del Mab específico original para un epítipo de la proteína LDLR anterior, o análogos, fragmentos y derivados de estos.

Los Mab anti-Id tienen así sus propios epítopos ideotípicos, o "idiótopos" estructuralmente similares al epítipo que está siendo evaluado. El término "anticuerpo monoclonal" también significa incluir tanto moléculas intactas así como también fragmentos de estos, tal como, por ejemplo, Fab y F(ab')₂, que son capaces de ligar antígenos. Los fragmentos F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se limpian más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos tejido no específico ligante que un anticuerpo intacto (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983)).

Se apreciará que el Fab y el $F(ab')_2$ y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en la presente invención se pueden utilizar para la detección y cuantificación de la proteína LDLR de acuerdo a los métodos descritos aquí para moléculas anticuerpo intactas. Tales fragmentos son típicamente producidos mediante escisión proteolítica utilizando enzimas tales como papaina (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos $F(ab')_2$).

Un anticuerpo monoclonal se dice que es "capas de ligar" una molécula si este es capas de reaccionar específicamente con la molécula para ligar de esta manera la molécula al anticuerpo. El término "epítopo" se refiere a aquella porción de cualquier molécula capas de ser ligada a un anticuerpo, la cual también puede ser reconocida por aquel anticuerpo. Los epítomos o "determinantes antigénicos" usualmente consisten de agrupaciones con superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como también características de carga específica.

Un "antígeno" es una molécula o una porción de una molécula capaz de ser ligado a un anticuerpo, cuyo antígeno es adicionalmente capaz de incluir un animal para producir anticuerpo capaz de ligarse a un epítipo de aquel antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítipo. La reacción específica a la que nos referimos anteriormente pretende indicar que el antígeno reaccionará de una manera altamente selectiva con un epítipo sobre su correspondiente anticuerpo y no con la multitud de otros anticuerpos que puedan ser evocados por otros antígenos.

Los anticuerpos, que incluyen fragmentos de anticuerpos, útiles en la presente invención se pueden utilizar para detectar cuantitativa o cualitativamente las proteínas LDLR en una muestra o para detectar la presencia de células que expresen las proteínas LDLR de la presente invención. Esto se puede lograr mediante técnicas de inmunofluorescencia que empleen un anticuerpo fluorescentemente etiquetado (ver adelante) acoplado con microscopia de fluorescencia, citométrica de flujo, o detección fluorométrica.

Los anticuerpos (o fragmentos de estos) útiles en la presente invención pueden ser empleados histológicamente, como en microscopía de inmunofluorescencia o de inmunoelectrón, para detección in situ de las proteínas LDLR de la presente invención. La detección in situ se puede lograr al remover el espécimen histológico de un paciente, y proporcionar un anticuerpo etiquetado de la presente invención a tal espécimen. El anticuerpo (o fragmento) se suministra preferiblemente al aplicar o al traslapar el anticuerpo etiquetado (o fragmentos) a una muestra biológica. A través del uso de tal procedimiento, es posible determinar no sólo la presencia de las proteínas LDLR sino también su distribución sobre tejido examinado. Utilizando la presente invención, aquellos de habilidad promedio percibirán fácilmente que cualquier amplia variedad de métodos histológicos (tal como los procedimientos de tñido) se pueden modificar con el fin de lograr tal detección in situ.

Tales ensayos para las proteínas LDLR de la presente invención comprenden típicamente la incubación de una muestra biológica, tal como un fluido biológico, un extracto de tejido, células cosechadas de manera fresca

tales como los lisositos o los leucocitos, o células que han sido encubadas en un cultivo de tejidos, en la presencia de un anticuerpo etiquetado capaz de identificar las proteínas LDLR, y detectar el anticuerpo mediante un número de técnicas bien conocidas en el arte.

La muestra biológica se puede acoplar al soporte de fase sólida o al portador tal como la nitrocelulosa, o a otros soporte sólido o portador que es capaz de inmovilizar células, partículas de célula o proteína solubles. El soporte o portador puede entonces ser lavado con amortiguadores adecuados seguido mediante el tratamiento con un anticuerpo etiquetado de acuerdo con la presente invención, como se noto anteriormente. El soporte de fase sólida o portador puede entonces ser lavado con el amortiguador una segunda vez para remover el anticuerpo no ligado. La cantidad de etiqueta ligada sobre dicho soporte o portador puede entonces ser detectado mediante medios convencionales.

Pro "soporte de fases sólidas", "portador de fase sólida", "soporte sólido", "portador sólido", soporte" o "portador" se pretende definir cualquier soporte o portador capaz de ligar antígeno o anticuerpos. Los

soportes bien conocidos o portadores, incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, amilasas de nylon, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, garbos y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble en alguna proporción o insoluble para los propósitos de la presente invención. El material de soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible en tanto que la molécula acoplada sea capaz de ligarse a un antígeno o anticuerpo. De esta manera, el soporte o la configuración del portador puede ser esférica como en un glóbulo, cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana tal como una lámina, tubo de ensayo, etc. Los soportes preferidos o portadores incluyen glóbulos de poliestireno. Aquellos expertos en la técnica sabrán poner otros portadores adecuados para ligar anticuerpo o antígeno, o serán capaces de averiguar lo mismo al utilizar la experimentación de rutina.

La actividad de unión de un lote dado de anticuerpo, de la invención como se anotó anteriormente, se puede determinar por medio de métodos bien conocidos. Aquellos

expertos en la técnica serán capaces de determinar condiciones operativas y de ensayo óptimas para cada determinación al emplear experimentación de rutina.

Otros de esos pasos como lavado, agitado, filtrado y similares pueden ser agregados a los ensayos como es acostumbrado o necesario para la situación particular.

Una de las maneras en la cual un anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede ser marcado es por medio de vincularlo a una enzima y ser usado en un inmunoensayo de enzima (EIA). Esta enzima, a su vez, cuando se expone posteriormente a un sustrato apropiado, reaccionara con el sustrato de tal manera que se produce una parte química que puede ser detectada por ejemplo, por espectrofotométrico por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que pueden ser usadas para marcar de manera detectable el anticuerpo incluyen, pero no están limitadas a, malato deshidrogenasa, nucleasa de estafilococo, Delta-5-Esteroides isómeras, deshidrogenasa de alcohol de levadura, alfa-glicerofosfato dehidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, oxidasa de glucosa,

betagalactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolin-esterasa. La detección puede ser llevada a cabo por métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogenico para la enzima. La detección puede ser llevada a cabo por comparación visual de la extensión de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con los estándares preparados similarmente.

La detección puede ser llevada a cabo usando una cualquiera de variedades de otros inmunoensayos. Por ejemplo, por marcación radioactiva de los anticuerpos o de fragmentos de anticuerpo, es posible detectar R-PTPasa por medio del uso de un radioinmunoensayo (RIA). Una buena descripción del RIA puede encontrarse en Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, by Work, T. S et al. Nort Holland Publishing Company, NY (1978) con referencia particular al capítulo titulado "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" por Chard, T,. Incorporado aquí como referencia. El isótopo radioactivo puede ser detectado por tales medios como el uso de un contador g o un contador de cintilación o por auto radiografía.

También es posible marcar un anticuerpo de acuerdo con la presente invención con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado fluorescentemente es expuesto a luz de longitud de onda apropiada, su presencia puede entonces ser detectada debido a su fluorescencia. Entre la mayoría de compuestos marcados por fluorescencia usados comúnmente están el isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, picocianina, aloficocianina, o-fitaldehído y fluorescamina.

El anticuerpo también puede ser marcado de manera detectable usando metales que emiten fluorescencia tales como ^{152}E , u otros de la serie lantanida. Estos metales pueden estar sujetos al anticuerpo usando tales grupos quelantes de metal como el ácido de dietilenetriamina pentaacético (ETPA).

El anticuerpo también puede ser marcado detectablemente por medio de acoplarlo a un compuesto quemoluminiscente. La presencia de anticuerpos marcados quemoluminiscentemente es entonces determinada al detectar la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos de marcado quemoluminiscentes útiles particularmente

están el luminol, el isoluminol, el ester de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y ester de oxalato.

Similarmente un compuesto bioluminiscente puede ser usado para marcar el anticuerpo de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quemoluminiscencia encontrado en sistemas biológicos en el cual la proteína catalítica incrementa la eficiencia de la reacción quemoluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente es determinada al detectar la presencia de luminiscencia. Compuestos bioluminiscentes importantes para estos propósitos de marcado son la luciferina, la luciferasa y el aecorina.

Una molécula de anticuerpo de la presente invención puede ser adaptada para utilizarse en un ensayo inmunométrico conocido también como ensayo "de dos sitios" o "de emparedado". En un ensayo inmunométrico típico, una cantidad de anticuerpo no marcado (o fragmentos de anticuerpo) es ligado a un soporte sólido o portador y una cantidad de anticuerpo soluble marcado detectablemente es agregado para permitir la detección y/o la cuantificación del complejo terciario formado

entre el anticuerpo de fase sólida, el antígeno, y el anticuerpo marcado.

Ensayos inmunométricos típicos y preferidos, incluyen los ensayos "delanteros" en el cual el anticuerpo ligado a la fase sólida es contactado en primer lugar con la muestra que va a ser ensayada para extraer el antígeno de la muestra por formación de una fase sólida binaria del complejo anticuerpo-antígeno. Después de un periodo de incubación adecuado, el soporte sólido o portador es lavado para remover el residuo de la muestra fluida incluyendo el antígeno que no ha reaccionado. Si existe cualquiera y luego se pone en contacto con la solución que contiene una cantidad desconocida de anticuerpo marcado (que funciona como una "molécula reportera"). Después de un segundo periodo de incubación para permitir que el anticuerpo marcado se forme en complejo con el antígeno ligado al soporte sólido o portador a través del anticuerpo no marcado, el soporte sólido o portador es lavado una segunda vez para remover el anticuerpo marcado que no ha reaccionado.

En otro tipo de ensayo "emparedado", que puede también ser útil con los antígenos de la presente

invención, los así llamados ensayos "simultáneos" y "inversos" son usados. Un ensayo simultáneo involucra una etapa única de incubación como a medida que el anticuerpo se liga al soporte sólido o portador y el anticuerpo marcado ambos estén agregados a la muestra que es ensayada al mismo tiempo. Después de que la incubación ha sido completa, el soporte sólido o portador es lavado para remover el residuo de muestra de fluido y anticuerpo marcado que no ha sido formado en complejo. La presencia del anticuerpo marcado asociado con el soporte sólido o portador es entonces determinada y sería un ensayo convencional "delantero" tipo emparedad.

En el ensayo "inverso", la adición en la primera etapa de una solución de anticuerpo marcado a la muestra de fluido seguida por la adición del anticuerpo no marcado ligado al soporte sólido o portador después de un periodo de incubación adecuado es utilizado. Después de una segunda incubación, la fase sólida es lavada de una manera convencional hasta liberarla del residuo de la muestra que esta siendo ensayada y la solución del anticuerpo marcado que aún no ha reaccionado. La determinación del anticuerpo marcado asociado con el

soporte sólido o portador es entonces determinada como en los ensayos "simultáneos" y "delanteros".

La invención será ahora ilustrada por los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Preparación de CHO r-hsLDLR

Células recombinantes de CHO estables que expresan el LDLR soluble humano fueron generadas por cotransfección de células CHO-DUKX a las cuales les faltaba el gen de dehidrofolato reductasa (DHFR) (Urlub, g. ET AL., 1980) con dos vectores de expresión psLDLR01 que contiene el dominio del N-terminal del ligando de enlace del LDLR, iniciando un residuo de ácido amino Asp(+4) hasta el Glu 291(+291), y el pDHFR, que contiene el gen murina para el DHFR, ambos controlados por el promotor y los elementos de terminación de transcripción de la región temprana SV40. La transfixión fue llevada a cabo por liposomas catiónicos usando lipofectamina (Gibco BRL), de acuerdo por el protocolo descrito por el fabricante. 72 horas después de la transfixión fueron

transferidas a un medio selectivo que carecía de oxi y ribonucleosidas y fue suplementado con 10% de FCS dialisada. Las células que expresaron actividad DHFR fueron capaces de formar colonias las cuales fueron aisladas al levantar las células con discos de papel empapados en tripsina. Las células fueron hechas crecer y se tamizaron para la actividad R-hsLDLR. Las células transfectadas fueron entonces sometidas a la amplificación de genes por MTX seguido por subclonación y selección de los clones productores estables.

El r-hsLDLR (forma +291) fue producido con células de un clon productor de CHO estable designado como #33-10-29-21, en un biorreactor celliGen de 5 litros en un medio libre de suero (Gibco CHO-A-SFM Cat. No. 95-0091DJ). La cosecha cruda fue clarificada por filtración por medio de un filtro de cartucho de 0.8 a 0.3 μ (Gelman Cat. No. CSS92DSCCK) y concentrado 100 veces sobre una membrana de 5-kDa. La forma +291 del R-hsLDLr usado para las primeras inmunizaciones fue purificada usando un proceso de purificación en pequeña escala. En este proceso una columna de intercambio de Cation de DEAE-Sefarosa fue usada, seguido por una etapa de interacción hidrofoba sobre una columna de BUTIL-TSK seguido por una

columna de HTP y una cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) sobre una columna de sefacril 100. La fracción #27 del SEC, fue escogida, ya que contenía una actividad antiviral específica de 700 unidades/ μ g detectadas en el ensayo antiviral descrito en el ejemplo 9 que sigue. La proteína en esta fracción fue identificada como r-hsLDLR por el análisis de N-terminal.

Una segunda tanda, de CHO +291 r-hsLDLR fue purificada y usada para aumentar las inyecciones en ratones. Esta fue purificada usando un proceso refinado que tenía un producto mejorado el cual incluye las siguientes etapas: a) Clarificación y concentración x100 de la cosecha cruda; b) Una columna de intercambio de anión HK POROS, y c) dos interacciones hidrofóbicas de tapa (HIC): Se captura sobre una columna de Butil-TSK y se fluye por medio de una columna Fenil 5PW. La fracción no ligada desde la última etapa HIC fue dializada y purificada sobre una columna de intercambio de catión HS-POROS. La última etapa fue una columna de Hidroxiapatita (HTP). El r-hsLDLR así obtenido fue purificado hasta cerca del 90% eluyendo como un pico mayor único en RP-HPLC.

Ejemplo 2 Inmunización de Ratones

10 µg del r-hsLDLR purificado de la fracción #27 de la columna SEC del ejemplo 1 a una concentración de 100 µg/ml, fueron homogeneizadas con adyuvante Completo Freund's (CFA, 50% v/v) y se inyectaron dentro de las almohadillas de los pies de cada uno de los cinco ratones hembra de siete semanas de nacido Balb/C.

Cuatro semanas después de la primera inmunización, los ratones fueron reforzados de manera intramuscular con 10 µg de la misma fracción del r-hsLDLR purificado en una solución al 50% (v/v) de CFA.

Dos semanas después de la segunda inyección el suero de los ratones fue ensayado en cuanto a anticuerpos para r-hsLDLR usando el ELISA directo descrito en el ejemplo 3 que sigue.

Los dos ratones M-1 y M-2, con la inmunoreactividad específica más significativa con r-hsLDLR fueron posteriormente reforzados, diez semanas después de la segunda con 10 µg del r-hsLDLR purificado obtenido en el

proceso de purificación refinado descrito en el ejemplo 1 anterior.

Los ratones fueron desangrados catorce semanas después y ensayados en cuanto a anticuerpos para el r-hsLDLR. Se le dieron a ellos dos refuerzos adicionales de μg de r-hsLDLR en PBS: El primero intraperitoneal y el segundo, dos días después, tanto intraperitoneal como intravenoso.

Los ratones se les saco sangre dos semanas después de la segunda inyección y se ensayo el antisuero para la actividad anti-r-hsLDLR por ELISA directo del ejemplo 3 que sigue. Cada antisuero fue diluido serialmente 1:100-1:32.000 y fue aplicado en duplicados a una placa de 96 pozos recubierta con 10U/pozo de r-hsLDLR purificado usando el proceso de purificación refinado descrito en el Ejemplo 1 anterior. La carga del ensayo y el DMEM +10% HS que contenía PBS +1% BSA o gelatina +0,05% Tween 20 + 0,05% de timerosal fueron usados como blancos en el primer pozo de cada fila. El suero de ratón normal (NMS) fue aplicado en el mismo rango de dilución en las últimas dos filas como controles negativos. La absorbencia de las reacciones enzimáticas fue medida con un lector ELISA en 492 y 405 nm.

Los resultados de este ensayo indicaron que el suero del ratón M-1 tenía una inmunoreactividad específica mayor con r-hsLDLR Y fue por lo tanto sacrificado y sus células del vaso fueron recolectadas por fusión con células de mieloma (Eshhar Z, 1985).

Ejemplo 3 ELISA directo para ensayo de antisuero y tamizado de clones de hibridoma

El ELISA directo para tamizado en cuanto a antisuero positivo fue llevado a cabo como sigue: Placas de 96 pozos fueron recubiertas con 11 μ l de r-hsLDLR (purificado por el proceso de purificación refinado del ejemplo 1) 100 Unidades/ml (10U/pozo) en PBS + 1% de gelatina (Sigma, Cat. No. G-7765) + 0.9mM Ca^{+2} y 0.5mM de Mg^{+2} , pH 5.6, de aquí en adelante es referido como el ensayo de carga, durante 90 minutos a 37°C con agitado. Las placas fueron 6 veces en PBS +0,05% de Tween 20 (Polioxietileno-Sorbitan monolaurato- Sigma p-1379), referido de aquí en adelante como la solución de lavado.

Las muestras de antisuero a partir de los ratones inmunizados serialmente diluida 1:100-1:32,000, o el

sobrenadante de los cultivos de células de hibridoma fueron agregados a las células e incubados durante 90 minutos a 37°C, mientras se mantenía agitándose seguido por seis lavados en la solución de lavado.

100 µl de peroxidasa de rábano picante (HRP)-APA conjugado con anticuerpo de cabra a la Fab de ratón (Sigma- Cat. No. 4601-1) diluido 1:1,200 fueron agregados a los pozos e incubados durante 90 minutos a 37°C, mientras se agitaba, y luego fueron lavados 6 veces con la solución de lavado.

100 µl de la solución de sustrato (preparada por medio de disolver una tableta de OPD y una tableta de H₂O₂ en 20 ml de agua) fueron agregados a los pozos e incubados en RT durante 30 minutos. La reacción enzimática fue detenida por la adición de 100 µl/pozo de HCL a 4N.

La absorbancia en las placas de 96 pozos fue leída usando el lector ELISA a 492 y 405 nm y los resultados fueron calculados usando 4 algoritmos logísticos paramétricos, por el software MultiCalc del computador PC enlazado con el lector ELISA.

Ejemplo 4 Fusión, preparación de hibridoma, selección de clones y purificación de anticuerpos a partir de fluidos de ascitis.

El proceso de fusión y de selección de células de hibridoma fue llevado a cabo de acuerdo con los protocolos en Eshhar Z, 1985. Brevemente, células de vaso del ratón M-1, reforzadas durante 2 a 4 días antes de la fusión fueron fundidas con células de mieloma durante una incubación corta con PEG. El PEG fue primeramente diluido lentamente con DMEM y luego completamente diluido por centrifugación. Las células fueron resuspendidas en un medio de DMEM-HAT, distribuidas en placas de 96 pozos a una concentración de cerca de $3,14 \times 10^4$ células/pozo e incubadas durante 10 a 14 días en un incubador de CO₂ al 8% a 37°C. El medio de todo los pozos de hibridoma fue cambiado a DMEM suplementado con suero de caballo al 10% (HS) durante 10 días. Las muestras de sobrenadante de hibridoma fueron tamizadas para detectar la presencia de Mab a r-hsLDLR por el ELISA directo descrito en el ejemplo 3 anterior. El ensayo de carga y el DMEM +10% de HS fueron usados como blancos, Mab C7 (Comercialmente disponible en Amersham) y el antisuero del ratón M-1

fueron usados como controles positivos, mientras que un anticuerpo monoclonal al receptor p55 TNF soluble fue usado como un control negativo. Las células de los pozos en las cuales la presencia de anticuerpos fue detectada en el sobrenadante de cultivo, fueron transferidas a placas de 24 pozos y luego a frascos de 25 cm². Los cultivos expandidos fueron monitoreados en cuanto a secreción de Mab a r-hsLDLR: Ampollas de células de cultivos positivos fueron congeladas y almacenadas en nitrógeno líquido.

Un total de aproximadamente 1000 cultivos fueron tamizados en cuanto a detectar anticuerpos para el r-hsLDLR. 54 cultivos con la inmunoreactividad más alta fueron reevaluados varias veces. 5 cultivos (12, 28, 29, 30 y 50) con la actividad mayor fueron clonados por dilución limitante en placas de 96 pozos. Los sobrenadantes de los clones crecidos fueron ensayados varias veces para anticuerpos a r-hsLDLR por el ELISA directo.

Las células de clones de hibridoma positivos fueron crecidas en frascos de cultivos de tejidos DMEM que contenía 15% de suero de caballo y las ampollas fueron

congeladas de parte de los cultivos. En paralelo, las células de diferentes clones de hibridoma fueron inyectadas a dos a cuatro ratones cada uno, para obtener fluidos de ascitis. Los anticuerpos fueron purificados del fluido de ascitis sea por precipitación de sulfato de amonio o sobre una columna de proteína G. Brevemente, 7,5 ml de fluido de ascitis fue diluido 1:3 en 20 mM carga de fosfato con un pH 7 y cargado sobre 5 ml columna de proteína G (C10/10). La columna fue lavada con 20 mM de carga de fosfato con pH 7 y los Mab fueron diluidos con 100 mM de carga de glicina con pH 2,7. El pH de la fracción de la dilución fue ajustado entre 7 a 7,5 con una carga tris 1M con pH 9,3.

Ejemplo 5: Tamizado para pares de Mab que son usados en ELISA y optimización de los parámetros ELISA.

Los Mab purificados de los fluidos de ascitis como en el ejemplo 4 anterior fueron usados para llevar a cabo un conjunto de experimentos en un formato de matriz para seleccionar el mejor par adecuado de Mab para ser usado como primero y segundos anticuerpos en el ELISA emparezado por r-hsLDLR descrito en el ejemplo 6 que sigue. Brevemente, placas de 96 pozos fueron recubiertas

con fluidos de ascitis derivados de los 5 hibridomas (# 12, 28.28, 29.08, 30 y 50.05) purificado sea por precipitación de sulfato de amonio o sobre una columna de proteína G. los anticuerpos fueron tamizados usando la forma +291 lo mismo que la forma +292 (del residuo de aminoácido Asp + 4 a Cys + 292) y +331 (del residuo de aminoácido ASp +4 a Cys + 331) del r-hsLDLR producidas en células CHO como antígenos. Un ml de cada uno de los anteriores Mab purificados parcialmente fueron marcados con biotin para un tamizado más rápido de su adecuabilidad como según los anticuerpos en un ELISA de emparedado. Brevemente 1,5 mg de Mab purificado por precipitación de sulfato de amonio fue ajustado a un pH de 8,5 con 30 µl de NaHCO₃ al 0,5 M. 0,75 mg de biotin-OSu N-Hidroxisuccinimido-biotin (biotin-OSu, Sigma, Cat. #H1759, de una solución de 5 mg de 200 de 5 mg de 200 µl de DMSO) fueron agregados a la solución de anticuerpo e incubadas durante dos horas a temperatura ambiente con agitación suave, seguido por una incubación durante la noche entre 2 a 8°C. La solución de reacción fue encargada sobre un Sefadex G-25M (Farmacia Cat. #17-0851-01) columna PD10 para separar entre los Mab biotinilados y el exceso de biotin-OSu que no había reaccionado.

Los primeros experimentos preliminares indicaron que los Mab 29.08 y 30 produjeron la señal más alta sobre los antecedentes, cuando fueron usados como segundos anticuerpos en el ELISA.

La reacción de estos dos clones fue ensayada nuevamente como segundos anticuerpos con los anticuerpos 12, 28, 29.08 y 50 usados para el recubrimiento de las placas. Los resultados de este experimento claramente mostró que el Mab 28 era el anticuerpo más adecuado para el recubrimiento.

Los mejores resultados, en términos de intensidad de señal y de especificidad, fueron obtenidos con el Mab 28 usado para recubrir la placa de micro titulación, y el Mab 29.08, marcado con biotin como segundo anticuerpo. Usando estos Mab buenos resultados fueron obtenidos con todas las tres formas (+291, +292 y +331) del r-hsLDLR. Con todas las formas, la absorbencia en 492/405 nm fue de cerca de 1,3 OD.

Las tres formas del antígeno r-hsLDLR fueron analizadas en diluciones seriales con un rango de concentración entre 0,9 a 1000 ng/ml. Una curva de

respuesta de dosis fue obtenida con Mab 28 usado para recubrir y Mab biotinilado 29.08 como un segundo anticuerpo. Esta combinación dio una respuesta lineal en un rango de concentración de 1 a 10 ng/ml de r-hsLDLR.

Los diversos parámetros que pueden afectar el ensayo de ELISA tales como concentración de reactivos, periodos de incubación, selección de cargas y placas fueron optimizados ensayando con los siguientes parámetros:

- ☐ Recubrimiento de los pozos de la placa de micro titulación con 5 a 10 µg/ml de Mab28 en PBS
- ☐ Composición de la carga:
 - a) PBS + Tween 20
 - b) Tris + Ca^{+2} + NaCL + Tween 20
- ☐ Soluciones de bloqueo:
 - a) 1% de gelatina en PBS, 0,05% de Tween, 0,005% de timerosal
 - b) 1% de BSA en PBS, 0,05% de Tween, 0,005% de Timerosal
 - c) 1% de FBS en PBS, 0,05% de Tween, 0,005% de Timerosal
 - d) 1% de leche en PBS, 0,05% de Tween, 0,005% de Timerosal
 - e) Bloque I, Hy Pep Hy levadura

□ Segundo Mab 29.08, marcado con biotin en concentraciones de 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10000 equivalentes en un rango de concentración entre 10,74 a 0,537 µg/ml.

□ Concentraciones de extravidina: 1:500, 1:1000, 1:200, 1:4000, 1:8000, 1:10000 equivalente en un rango de concentración de entre 4 a 0,2 µg/ml.

Sobre la base de estos experimentos el procedimiento final para el ensayo de ELISA empareado descrito en el ejemplo 6 que se sigue se estableció.

Ejemplo 6 Establecimiento de un ELISA de empareado para r-hsLDLR

Un ELISA de empareado para el r-hsLDLR fue establecido usando Mab 28 y 29.08. Brevemente la placa con 96 pozos fue recubierta con 100 µl de un Mab 28 purificado con proteína G (5 µg/ml) durante la noche entre 2 a 8°C o tres horas a 37°C. Las placas fueron entonces lavadas 5 veces con PBS + 0,05% de Tween 20. Las placas entonces fueron incubadas con 200 µl de la

solución de bloqueo (PBS + 1% de BSA o Gelatina + 0,05% de Tween 20 + Timerosal 0,05% durante una hora a 37°C o durante la noche a 4°C y lavado 5 veces con PBS más 0,05% de Tween 20. 100 µl de las muestras o del antígeno de curva de calibración (CHO + 291 r-hsLDLR, 0,5 a 32 ng/ml diluido en solución de bloqueo), fueron agregados a los posos e incubados durante 90 minutos a 37°C con agitación. Las placas fueron entonces lavadas 5 veces con PBS + 0,05% Tween 20.

Se agrego Mab 29.08 biotinilada en 100 µl/pozo (0,67 µg/ml) en solución de bloqueo, y se incubo con agitación durante una hora a 37°C. Las placas fueron lavadas 5 veces con PBS + 0,05% de Tween 20. 100 µl de un conjugado de extravidina-peroxidasa comercial, (ExtraAvidin TM-Peroxidasa BioMakor, Cat.# 0645-1) diluida 1:10000 fueron agradas a los pozos e incubada con agitación durante una hora a 37°C. Las placas fueron entonces lavadas 5 veces con PBS + 0,05% de Tween 20. 125 µl de la solución de sustrato anteriormente mencionada fueron agregados a cada pozo y fueron incubados durante cerca de 10 minutos hasta que se desarrollo color en la intensidad deseada. La reacción fue detenida agregando 125 µl de HCl al 4N. La absorbencia en las placas de 96 pozos fue leída usando el

lector ELISA en 492 y 405 nm de longitudes de onda y los resultados fueron calculados por el software MultiCalc del computador PC vinculado con el lector ELISA.

Ejemplo 7 Isotipo de anticuerpos monoclonales

El isotipo Ig de anticuerpos monoclonales fue determinado usando un Kit de isotipo comercial (PharMingen Internacional) de acuerdo con el procedimiento de ensayo del fabricante. Los clones 12.6, 28, 29.8 y 30 fueron identificados como IGg1, mientras que el clon 50.31 fue encontrado que era de la clase IgM.

Ejemplo 8 Análisis blot Western SDS-PAGE

La forma +291 del r-hsLDLR purificado y el LDLR purificado nativo a partir de la orina humana fue analizado por el análisis western blot con los anticuerpos monoclonales desarrollados para el r-hsLDLR. Brevemente un 12% de SDS de poly Acrilamida gel fue cargado con 100 ng/carril de la forma CHO +291 del r-hsLDLR o el hsLDLR o TBP-1 urinario nativo de cosecha cruda (como control negativo) bajo condiciones de reducción (40 mM DTT). Una pista fue cargada con

marcadores de bajo peso molecular (LMW). Este conjunto de muestras fue corrido 5 veces. Las proteínas separadas sobre los geles fueron transferidas por electro elusión a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron encubadas en PBS que contenía 10% de leche baja en grasa, 0,1% de Tween 20, durante 16 horas. Las membranas fueron cortadas en tiras y cada tira fue incubada durante 2 horas a temperatura ambiente con uno de los 5 Mab seleccionados: 12.6, 30, 50.30, 28 o 29.08 (fluidos de ascitis diluidos 1:4000).

Las tiras de las membranas fueron lavadas con PBS que contenía 0,1% de Tween 20 (3x15 min) e incubada durante una hora con el segundo anticuerpo - cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa-alcalino fosfatasa de rábano picante (diluido 1:10000, BioMarkor) durante dos horas a temperatura ambiente.

Las tiras fueron lavadas con PBS que contenía 0,1% de Tween 20 (3x15 min). Las bandas positivas fueron detectadas por mejoramiento quimolumincente (ECL, Amersham).

Los anticuerpos monoclonales #12.6 y #29.8 reconocieron ambos la urinaria como en la forma +291 del r-hsLDLR purificado en el análisis western blot (figura 2). Los Mab 28 y 30 reconocieron la forma +291 del r-hsLDLR purificado.

Ejemplo 9 Inhibición de la actividad antiviral r-hsLDLR por anticuerpos monoclonales

Los Mab que específicamente reaccionaron con el r-hsLDLR fueron ensayados en cuanto a su habilidad para bloquear la actividad antiviral del r-hsLDLR forma (+291) in Vitro, usando un ensayo de inhibición de efecto citopático (CPE) en un sistema VSV/WISH.

Las células WISH (de origen amnion humano) fueron cultivadas en MEM suplementadas con 10% de FBS y 4 mM de glutamina en un incubador a 37°C con CO₂ al 5%. Las células que crecieron exponencialmente fueron sembradas en placas de cultivo de tejidos de 96 pozos, a una densidad de 40000/pozo durante 24 horas antes de la iniciación del ensayo. Las muestras fueron ensayadas y el estándar fue diluido y dispensado dentro de los pozos que contenían las células. El VSV fue inmediatamente agregado

a los pozos, a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,5 pfu/célula. Las placas fueron incubadas entre 16 a 18 horas a 37°C y fueron entonces lavadas con etanol. La monocapa de células sobrevivientes fue vista por manchado con Violeta Cristal Gram. La cuantitación del efecto citopático relativo al estándar fue llevado a cabo graficando la densidad de color contra la concentración estándar.

Para el análisis del efecto neutralizante de los anticuerpos, el r-hsLDLR fue pre-incubado durante 30 minutos a 37°C, con concentraciones aumentantes de fluido de ascitis del Mab ensayado. Estas soluciones fueron entonces agregadas a los cultivos de las células WISH en 96 placas de micro título, seguido por la adición de virus vesicular somatititis (VSV). Después de 18 horas de incubación, la lisis de células mediadas por el VSV fue determinado por el manchado de las células remanentes con violeta cristal. La semi-cuantitación del efecto citopático relativo con el estándar fue llevado por medio de graficar la intensidad de color (determinado por un lector ELISA) contra la concentración estándar.

El efecto de los Mab fue ensayado con concentraciones e incrementadas de r-hsLDLR. Como se muestra en la tabla 1 dos Mab (12.6 y 50.30) se hallaron que mostraban una actividad neutralizante.

En el experimento mostrado en la tabla 1, el efecto inhibitorio de los dos Mab fue ensayado a una dilución de 1:40 de los fluidos de ascitis. En esta dilución, el Mab 12.6 mostró una actividad algo mayor que el Mab 50.30. Esto puede resultar de las propiedades de los Mab al igual de las diferencias en sus concentraciones en el fluido de ascitis.

El efecto inhibitorio de los Mab se puede sobreponer incrementando el r-hsLDLR relativo con la concentración Mab. De hecho Concentraciones de r-hsLDLR de 62,5 U/ml, ningún Mab tenia ningún efecto sobre la actividad r-hsLDLR en la concentración de anticuerpo analizada.

Tabla 1: Inhibición de la actividad antiviral del r-hsLDLR por los clones 12.6 y 50.30*

VSV/Mab	Concentración de LDLR (U/ml)			
	0	2.5	12.5	62.5
-VSV	1.5	1.2	1.6	1.5
+ VSV	(0.25)	1	7 (1.7)	1.7
+VSV+clon 50.30	6 (0.4)	0.88	(1.25)	1.62
+VSV+clon 12.6	5 (0.5)	0.77	7 (0.7)	1.67

* Inhibición de la actividad antiviral r-hsLDLR contra la lisis de células mediadas por VSV de células WISH. El efecto inhibitorio de los Mab fue determinado a una dilución de 1:40 del fluido de ascitis. El número de células viable es representado en la tabla en valores OD. Los números entre corchetes representan repetición llevada a cabo en a 0 y 12.5 U/ml en concentraciones de LDLR.

La inhibición de la actividad antiviral del r-hsLDLR fue determinada usando concentraciones incrementadas de Mab 12.6 y 50.30. El Mab 12.6, inhibió la actividad antiviral del r-hsLDLR, en aproximadamente 60% en una dilución de 1:40 (del fluido ascitis) y en aproximadamente 35% en una dilución de 1:20500. El clon 50.30 inhibió la actividad del r-hsLDLR en aproximadamente 45% a una dilución de 1:40 y aproximadamente del 15% a una dilución de 1:20500.

La curva de respuesta, de dosis obtenida con ambos Mab, y la observación de que su efecto inhibitorio no estaba emparejado por el exceso de r-hsLDLR, sugiere que los Mab ejercen su efecto por ligado al r-hsLDLR.

Ejemplo 10 Inhibición de la replicación HCV por anticuerpos monoclonales

Los Mab específicos para el r-hsLDLR fueron ensayados en su habilidad para inhibir la replicación HCV en hepatocitos en cultivos primarios. Los cultivos de células FT167 se derivaron a partir de pacientes machos de 57 años de edad que requerían una resección de lobectomía para propósitos médicos (metástasis de un tumor del colon lóbulo derecho).



Los cultivos primarios de los hepatocitos humanos fueron preparados por las dos etapas del método de perfusión de colagenaza (Laurel P. Adv. Drug DEL. Rev. 22:105-132 (1996), Pichard L. et al. Mol. Pharmacol. 41:1047-1055 (1992), Ferrini JB. Et al. Chembiol Interactions 107:31-45 (1997)). La viabilidad de las células antes de platear fue determinada usando un ensayo de exclusión azul tripan. Cuatro millones de células en tres ml de medio de cultivo fueron colocadas en platos plásticos de 60 mm tres recubiertos con colágeno. El medio de cultivo libre de suero de largo término consistía de William E suplementado como se publicó (Lanford r. et al. In Vitro Cell Dev. Biol. 25:174-182 (1989)). Este medio fue subsecuentemente renovado cada 48 horas. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda de aire y 5% de dióxido de carbono. Bajo estas condiciones de cultivo, los hepatocitos humanos retienen su fenotipo diferenciado durante por lo menos 35 días (ferrini JB. et al., Chem-Biol Interactions 107:35-41 (1997)) y son sensibles a la infección HCV y permiten o permisivos a la replicación del genoma viral (Fournier C. Et al. J. Gen Virol. 79:2367-2374 (1998)).

La muestra de suero positivo al HCV: un banco de suero humano de pacientes ensayados en cuanto al anticuerpo anti HCV positivo por el EIA HCV 3.0 y quiron RIBA HCV 3.0 SIA ha sido establecido. Ninguno de estos pacientes fue co infectado con HBV o HIV. En cada muestra de suero HCV RNA el RNA fue cuantificado por el monitor Roche y genotipado por un ensayo de probeta de línea (Inno -Lipa HCV II, Innogenetics). Las muestras de suero fueron almacenadas a menos -80°C, en pequeñas alícuotas para poder evitar los ciclos de congelamiento-de hielo. En estos experimentos la muestra es de 42 (genotipo 1b; carga viral: 410 000 copias/ml) fue usado.

Para la infección y tratamientos subsecuentes, los cultivos de hepatocito fueron transferidos bajo condiciones estériles a un laboratorio P3 (alto confinamiento para microorganismos infecciosos humanos). Tres días después de plantados, cuando las células han sido recuperadas del traumatismo del aislamiento, la infección in Vitro de hepatocitos fue llevada a cabo durante incubación en la noche con 25 µL de suero positivo de HCV (S42) en 3mL de medio. Después de la infección, las células fueron lavadas tres veces con 3mL

107

de medio fresco y el cultivo fue continuado bajo condiciones normales en medio del cultivo de largo término.

Las células fueron tratadas con 3 diferentes Mab contra r-hsLDLR, el Mab 12.6, el Mab 28 y el Mab 29.8. Treinta minutos antes de la infección, las células fueron expuestas a 2 o 8 μ /ml de los diferentes Mab. Estas células fueron infectadas como se describió anteriormente.

Los cultivos de control fueron infectados bajo condiciones similares pero en la ausencia de tratamiento antiviral. En experimentos paralelos, los mismos cultivos fueron tratados con 5000 μ /mL de IFN α , bajo condiciones similares por comparación el IFN α , inhibe fuertemente la replicación HCV de las células referencia). Todos los tratamientos fueron llevados a cabo en duplicado.

En el día 5 de post infección, el medio fue removido y los cultivos lavados tres veces con un fosfato frío cargado con sal. El RNA fue purificado entre 4 x 10⁶ hepatocitos usando un procedimiento de extracción por

fenol ácido de isocianato guanidinio (Chomezynski PN. And Sacchi N. *Analyt. Biochem.* 162: 156-159 (1987)). El RNA precipitado fue disuelto en 50µ de dietilpirocarbonato (DEPC)-t agua y cuantificado. Un µgde RNA celular fue analizado en el ensayo de hilo específico de rTth RT-PCR. Evitar posible contaminación, el ensayo de hilo específico RT-PCR fue llevado a cabo secuencialmente usando tres cuartos diferentes: un cuarto pre-PCR, un cuarto PCR y un cuarto post PCR. El RNA disuelto en 10µl de DEPC- tratado con agua fue cubierto con agua mineral y calentado a 95°C durante un minuto. La temperatura fue bajada a 70°C y 10µl de la reacción cDNA precalentada de mezcla fue agregada. La temperatura fue entonces bajada a 60°C durante 2 minutos para templado y la reacción cDNA fue llevado a cabo durante 20 minutos a 70°C usando la polimeraza de DNA rTth (Perkin Elmer). La temperatura fue mantenida a 70°C mientras que 40µl de una carga precalentada que contenía EGTA como quelatante de Mn^{2+} fue agregada para suprimir la actividad rTth RT. Los tubos de reacción fueron mantenidos a 70°C mientras que 40µl de la mezcla PCR precalentada fue agregada. Las condiciones PCR llevadas a cabo sobre el sistema Gene Amp® PCR 9600 (Perkin-Elmer), consistieron en un ciclo

inicial a 94°C durante un minuto, 50 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 58 °C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y una etapa de extensión final a 72°C durante 7 minutos. Para el ensayo positivo de la cadena HCV RNA, la secuencia del nucleótido del iniciador inverso P3 es: 5'-TGG/ATGCACGGTCTACGAGACCTC-3', (nt 342-320) y aquel del iniciador P4 delantero es: 5'-CACTCCCCTGTGAGGAACT-3', (nt: 38-56), (Laskus T. Et al. J. Gen. Virol. 78:2747-2750 (1997)). Los mismos imprimantes fueron usados en orden inverso para detectar la cadena negativa. Un décimo del producto amplificado fue analizado por electroforesis de gel sobre agarosa (2%), seguido por coloración con BET y fotografía bajo luz UV. En todas las series de experimentos, las diluciones del HCV RNA sintético (+) Y (-) fueron hechas y un µg de RNA de hígado total fue agregado a la mímica de las condiciones para el análisis de los hepatocitos cultivados, Estas mezclas fueron usadas como controles positivos para los ensayos y análisis RT-PCR.

La figura 3 muestra que la producción del hilo de la secuencia negativa HCV, en la presencia del Mab contra LDLr fue completamente inhibida en el cultivo FT167. Por

lo tanto la replicación del genoma viral fue inhibida fuertemente. Los resultados fueron consistentes con el punto de vista de que el LDLR puede ser un receptor para el HCV.

Ejemplo 11 producción de anticuerpos quiméricos para el LDLR

El mRNA es purificado a partir de una línea de hibridoma que produce mAB específico para el LDLR.

El cDNA específico sintetizado con oligonucleótidos complementarios al extremo 5' del exón CH1 a partir de una cadena gruesa de dominio variable (oligo 1) y desde el 5' del Ckhexon del dominio de variable de cadena liviana (oligo 2) usando el mRNA purificado como una plantilla.

Dos cDNA son obtenidos uno de los cuales codifica la región variable (específica para el LDLR) de cadena gruesa, y el otro la región variable (específica para el LDLR) de la cadena liviana. Los cDNA son clonados y secuenciados.

Para la construcción de la cadena pesada quimérica, la región variable de un gen de cadena pesada Ig humano clonado es intercambiado (usando manipulaciones genéticas) para el DNA clonado que codifica el dominio variable de ratón (específico para LDLR) de cadena pesada. Las manipulaciones genéticas incluyen la escisión de la región variable para el Ig humano, usando enzimas de restricción específica y de ligación de la región de un variable del ratón. El mismo procedimiento es llevado a cabo para obtener la cadena liviana quimérica.

Dos plásmidos de expresión de mamíferos son contruidos, una que incluye el gen de cadena pesada quimérica y el otro que incluye el gen de cadena liviana quimérica. Ambos vectores son usados para cotransfectar la línea de células de hibridoma (SP6).

La producción de LDLR específico Ig no es ensayada por ELISA o por western blots usando sopas de cultivos de células transfectantes como según anticuerpos secundarios. La afinidad del anticuerpo quimérico a su ligando es monitoriada por Biacore.

Ejemplo 12 Preparación de ratón transgénico que ha sido manipulado con ingeniería genética para contener el loci de gen de inmunoglobulina humano (xenomice) y preparación del mAB humano contra el Hdlr.

La preparación del xenomice es descrita en WO 98/24893 y Mendez M,J. Et al Nature genetics 15: 146-56 (1997).

Los cromosomas artificiales de levadura humana (YAC) en sus librerías son tamizados para el YAC que contiene la región variable de cadena pesada humana (cerca de 1000 kb) (método de clonación YAC es el método de escogencia cuando se insertan tamaños mayores a 100 kb que los requeridos).

Los YAC se caracterizan por el análisis Southern blot y por la electroforesis Pulse Field (PFGE). Los YAC deben incluir el C μ C δ , Dh y Vh las regiones y en la configuración de líneas de gérmenes.

A través de la utilización de las secuencias traslapantes contenidas en los YAC, los YAC se recombinan en levadura mediante una estrategia de combinación paso a paso. Antes de la recombinación el YAC del extremo 3' (con la región V) se liga al marcador seleccionable PRET. La estructura del YAC recombinado se confirma mediante análisis PFGE y "Southern blot"

(presencia de locus de cadena pesada desde la región C hasta la región Vh en configuración de línea germinal)

El brazo acéntrico del YAC es marcado con un vector que lleva la región constante completa $\gamma 2$, un promotor de ratón, un gen de resistencia a la neomicina, para lograr la cadena pesada final que contiene la región variable completa por ejemplo los genes 82 Vh, los genes 6 Jh y tres regiones constantes diferentes C μ c δ C γ con sus secuencias regulatorias correspondientes. Este YAC es designado como YH2. Esta construcción es usada para la producción del xenorotón.

Una estrategia similar a aquella usada anteriormente se utiliza para la reconstrucción de loci

114

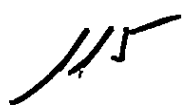
capa solamente que: el marcador de selección de neomicina es ligado al YAC reconstruido que contiene el loci capa completo. Este YAC es designado como Yk2.

Los YAC que contienen el Yh2 son introducidos dentro de células ES via fusión del YAC que contiene el esferoplasto de levadura con HPRT deficiente células ES de ratón deficiente E14.TG3B.

En las células positivas HPRT son seleccionadas. Los clones positivos son propagados y analizados por análisis Southern blots y por CHEF blot. Los clones que contienen el YH2 intacto YAC son seleccionados.

La introducción y selección del YAC Yk2 en células ES es llevada a cabo similarmente según se describió para el YAC yH2.

El YH2 que contiene las células ES son micro inyectadas en los blastocitos C57BL/6J DEL RATÓN. Los machos quiméricos producidos son evaluados en cuanto a la transmisión de línea de gérmenes para la progenia.



Los ratones transgénicos YH2 o Yk2 son crecidos con DI mice (homozigos para genes de ratón objetivo inactivado de loci de cadena capa y pesada). Cada uno de los yH2; de cadenas transgénicas DI son alimentados con Yk2; la cadena transgénica DI para generar las cadenas Xenoratón.

La reconstitución del desarrollo de células B y la producción de anticuerpos en el xenoratón se evalúa por citometría de flujo y ELISA.

La inmunización del xenoratón se lleva a cabo como se describió en el ejemplo 2.

Los métodos para la preparación de hibridoma y tamizado de clones positivos son similares a aquellos descritos en los ejemplos 3 y 4.

Los clones de hibridoma 12.6, 28, 29.8, 30 y 50.30 fueron depositados en la colección nacional de cultivos de microorganismos (CNCM), Institute Pasteur, Paris, bajo el tratado de Budapest y fueron depositados de acuerdo con los Nos. I-2390, I-2391, I-2392, I-2393 y I-2394, respectivamente.

REFERENCIAS

Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q. X. (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor [In process Citation]" Proc Natl Acad Sci U S A, 96(22), 12766-71.

Beisiegel, U., Schneider, W. J., Goldstein, J. L., Anderson, R. G., and Brown, M. S. (1981). "Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probes for study of receptor-mediated endocytosis and the genetics of familial hipercholesterolemia". J. Biol Chem, 256(22) 11923-31.

Bieri, S., Djordjevic, J. T., Daly N. L., Smith, R., and Kroon, P, A. (1995). "Disulfide bridges of a cysteine - rich repeat of the LDL receptor ligand-binding domain. "Biochemistry, 34 (40), 13059-65.

Brown, M. S., and Goldstein J. L. (1976). "Familial Hipercholesterolemia; A genetic defect in the low-density lipoprotein receptor. "N Engl J Med, 294(25), 1386-90.

Brown, M. S., and Goldstein J. L. (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. "Science, 232(4746), 34-47.

Chomezynski, P. N., And Sacchi, N. (1987) "Single -step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". Anality, Biochem. 162: 156-9.

Eshhar Z, 1985 "Monoclonal Antibody Strategy and Techniques" in "Hibridoma technology in the bioscience and medicine, "Edited by Timothy A. Springer(Plenum Publishing Corporation, 1985; Chapter 1).

Fischer, D. G., Tal, N., Novick, D., Barak, and Rubinstein, M. (1993), "An antiviral soluble form of the LDL receptor induced by interferonn". Science, 262(5131), 250-3.

Fischer, D. G., Novick, D., Cohen, B, M. (1994),"Isolation and characterization of a soluble form of the LDL receptor, an interferon-induced antiviral protein". Proc Soc Exp Biol Med 206(3), 228-32.

Ferrini, J.B., Pichard, L., Domergue, J., and Maurel, P. (1997). "Long-term primary cultures of adult human hepatocytes". Chem-Biol Interactions 107: 31-45.

Fournier, C., Sureau, Coste, J., Ducos, J., Pageaux, G., Larrey, D., Domergue, J., and Maurel, P. (1998) "In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus". J. Gen virol. 79: 2367-74.

Goldstein, J. L., Aderson, R. G., and Brown, M. S. (1979). "Coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis". Nature, 279(5715), 679-85.

Goldstein, J. L., Dana, S. E., Brunschede, G. Y., and Brown, M. S. (1975). "Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia: evidence for two different mutations affecting functions of low-density lipoprotein receptor". Proc Natl Acad Sci USA, 72(3), 1092-6.

Lanford R.E., Carey, K. D., Estlack, L.e., Smith, G. C., and hay, R. V. (1989) "Analysis of plasma protein and lipoprotein synthesis in long-term primary cultures of

baboon hepatocytes maintained in serum-free medium" In Vitro Cell Dev.Biol. 25: 174-82.

Laskus T., Radkowski, M., Wang,L.F., Cianciara, J., Vargas, H., and Rakela, J. (1997)"Hepatitis C virus negative strand RNA is not detected in peripheral blood mononuclear cells and viral sequences are identical to those in serum: a case against extra hepatic replication". J. Gen. Virol. 78:2747-50.

Maurel P. (1996) "The use of adult human hepatocytes in primary culture and other in vitro systems to investigate drug metabolism in man". Adv. Drug Del. Rev. 22:105-132.

Mendez, M. M., Green, L.L., j. R. F., Jia X-C., Maynard-Currie, E.E., Yang, X-D., Gallo, M. L., Louie, D. M., Lee, D.V., Erickson, K. L., Luna, J., Roy, C.M-N., Abderrahim, H., Kirshenbaum, F., Noguchi, M., Smith, D. M., Fukushima, A., Hales, J. F., Finer, M. H., Davis, C. G., Zsebo, K. M. And jakobovits, A. (1997). "Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice". Nature Genetics, 15, 146-56.

120

Pichard, L., Fabre, L., Daujat, M., Domergue, J., Joyeux, H., and Maurel, P. (1992). "Effect of corticosteroids on the expression of cytochromes P450 and on cyclosporin A oxidase activity in primary cultures of human hepatocytes". Mol. Pharmacol. 41: 1047-55.

Riachmann, L., Clark, M., Waldmann, H., and Winter, G. (1988). "Reshaping human antibodies for therapy. "Nature, 332,323-27.

Sudhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Russel, D. W. (1985). "The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. "Science, 228(4701), 815-22.

Urlaub, G. And Chasin, L.A. (1980) Isolation of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient in Dihydrofolate Reductase Activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220.

121

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal, anticuerpo quimérico, anticuerpo completamente humanizado, anticuerpo anti-anti-Id o fragmento de ellos que específicamente reconoce y se liga al receptor LDL humano y a fragmentos de él, excepto el anticuerpo monoclonal C7.

claro

2. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 que específicamente reconoce y se liga al receptor LDL soluble humano.

claro

3. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, que siendo el Mab expresado por el clon hibridoma 12.6 depositado en el CNCM bajo No. I-2390.

4. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, siendo el Mab expresado por el clon hibridoma 28 depositado en el CNCM bajo No. I-1291.

U.I. a las relaciones estructurales

5. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, siendo el Mab expresado por el clon hibridoma 29.8 depositado en el CNCM bajo No. I-2392.

6. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, siendo el Mab expresado por el clon hibridoma 30 depositado en el CNCM bajo No. I-2393.

U-1

7. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, siendo el Mab expresado por el clon hibridoma 50.30 depositado en el CNCM bajo el No. I-2393.

=6.

8. Anticuerpos monoclonales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 que pertenecen al isotipo de la inmunoglobulina IgG₁ o IgM.

9. Un método para la detección y/o cuantificación del LDLR humano que comprende el uso de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

diag.

10. Anticuerpos monoclonales de acuerdo con la reivindicación 1 que son capaces de ser usados como par en un ELISA.

11. anticuerpos monoclonales de acuerdo con la reivindicación 10, siendo los anticuerpos monoclonales generados por el clon hibridoma 28 o el clon 29.8.

result.

12. Anticuerpos monoclonales de acuerdo con la reivindicación 1 capaces de identificar el LDLR en análisis Western Blot.

13. Anticuerpos monoclonales de acuerdo con la reivindicación 12 siendo los anticuerpos monoclonales generados por el clon hibridoma 12.6, el clon 28, el clon 29.8 o el clon 30.

14. Anticuerpos monoclonales de acuerdo con la reivindicación 1 capaces de neutralizar la actividad biológica antiviral del (r-hsLDLR).

15. Anticuerpos monoclonales de acuerdo con la reivindicación 14 siendo los anticuerpos monoclonales generados por el clon de hibridoma 12.6 o clon 50.30.

16. Anticuerpos monoclonales de acuerdo con la reivindicación 1 capaces de inhibir la replicación del virus de hepatitis C.

17. Anticuerpos monoclonales de acuerdo con la reivindicación 16 siendo los anticuerpos monoclonales

124

generados por el clon de hibridoma 12.6, clon 28 o clon 29.8.

/18. El clon de hibridoma 12.6 depositado en el CNCM bajo el No. I-2390.

/19. El clon de hibridoma 28 depositado en el CNCM bajo el No. I-2391.

/20. El clon de hibridoma 29.8 depositado en el CNCM bajo el No. I-2392.

/21. El clon de hibridoma 30 depositado en el CNCM bajo el No. I-2393.

/22. El clon de hibridoma 50.30 depositado en el CNCM bajo el No. I-2393.

23. Un método para preparar un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende hacer crecer un hibridoma clonado que comprende una célula de vaso de un mamífero inmunizado con hsLDL y una célula linfoide homogénica o heterogénica en un medio líquido o

125

abdomen de mamífero para permitir al hibridoma producir y acumular el anticuerpo monoclonal.

24. Un método de acuerdo con la reivindicación 21 en donde el LDLR inmunogénico es altamente purificado de LDLR humano. *result*.

25. Un método para purificar LDLR humano que comprende poner en contacto un material que contiene el LDLR humano con un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

RESUMEN

Se suministran anticuerpos monoclonales al receptor LDL que son útiles para la identificación y purificación del LDL y en el tratamiento de por ejemplo la infección de hepatitis C.

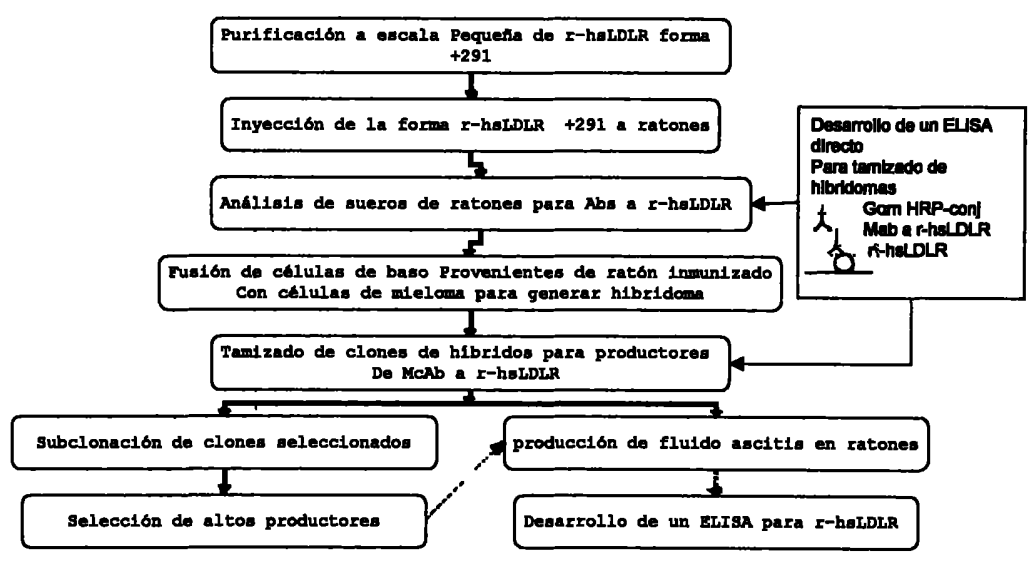


Figura 1

128

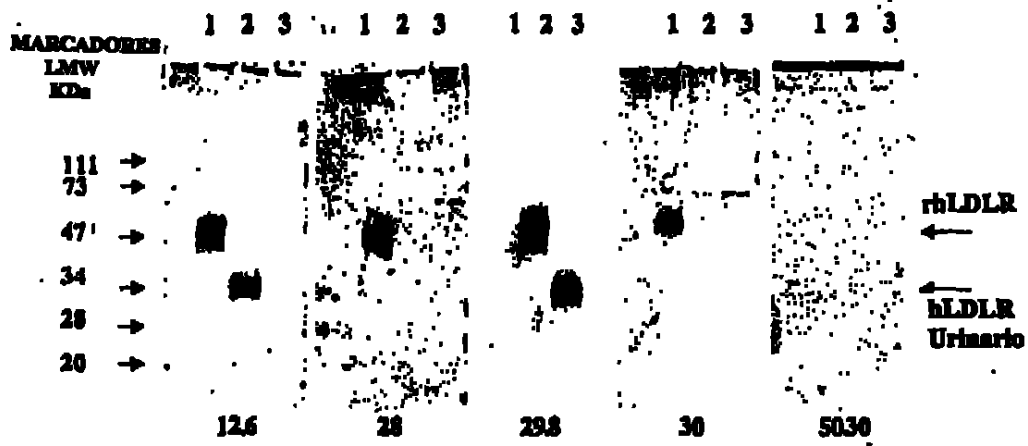


Figura 2

729

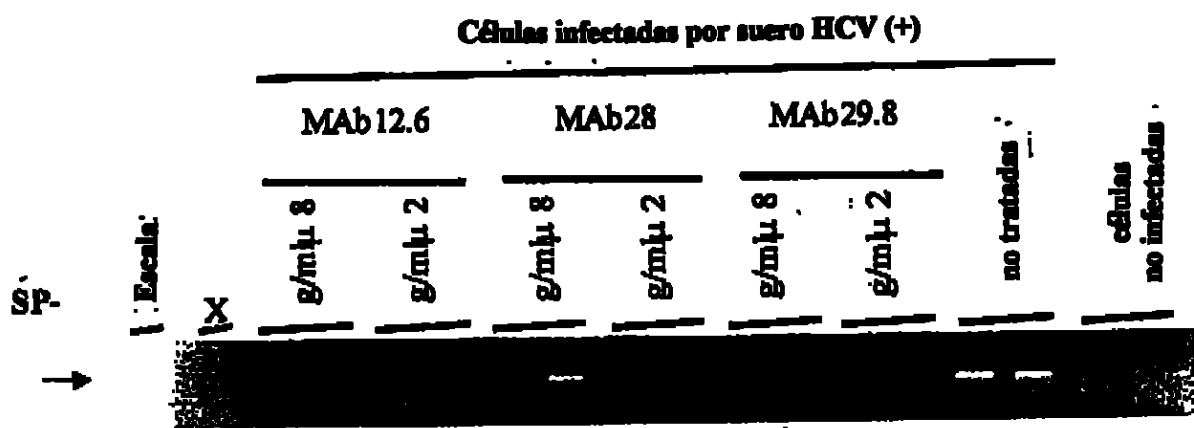
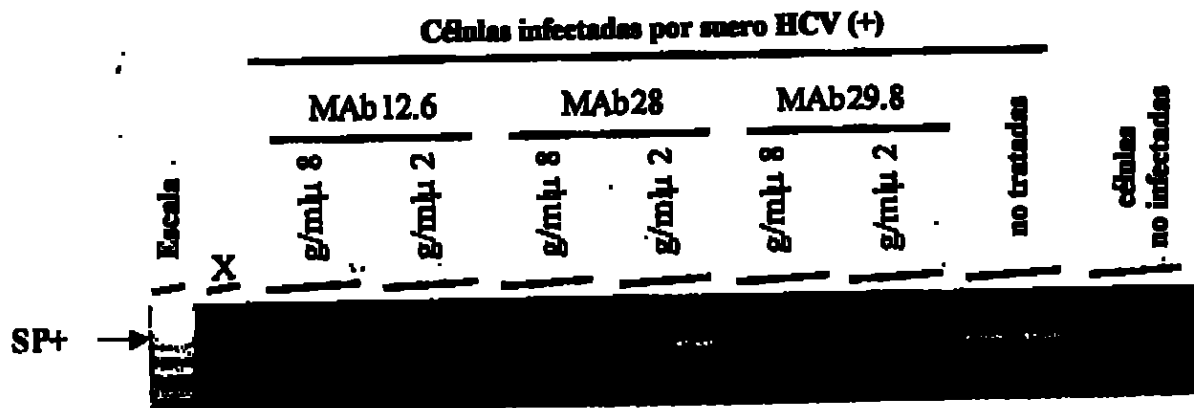


Figura 3



SUPERINTENDENCIA

Folios: 130

Transite : 011 PCT-PATENT 379 FINE WACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2826 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

HIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CASA : 02 - 56,216
FECHA : AGOSTO 26 DE 2002

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3344171	26/08/2002	34,463,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
		TOTAL :	\$ 378,000.00

SDN: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : 217

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

Qdo 13414-B41-001-9

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

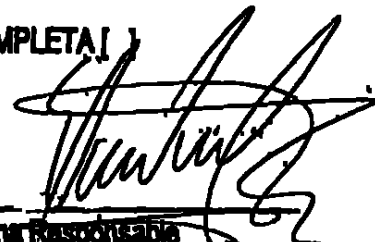
	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒	MODELO DE UTILIDAD ☐	☐
• Indicación de que se solicita la concesión de una patente	☐	☒
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	☐	☐
• Descripción de la invención	☐	☐
• Dibujos de ser estos pertinentes	☐	☐
• Comprobante de Pago de las tasas establecidas	☐	☐
COMPLETA ☒	INCOMPLETA ☐	☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

• Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	☐	☐
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	☐	☐
• Representación gráfica y foto gráfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño	☐	☐
• Comprobante de pago de las tasas establecidas	☐	☐
COMPLETA ☐	INCOMPLETA ☐	☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

• Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado.	☐	☐
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	☐	☐
• Representación gráfica del esquema de trazado	☐	☐
• Comprobante de pago de las tasas establecidas	☐	☐
COMPLETA ☐	INCOMPLETA ☐	☐


Firma Responsable

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación 00079394 00000000

Folios: 130

Fecha (HH) 2002-09-05 16:40:10
Proceso 1 811 PCT-PATENT 279 FASE NNCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No 27-00 Piso 2 mezzanina
Conmutador 362 08 40
Fax 150 52 20 e-mail info@sic.gov.co
Bogotá D C - Colombia



2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
EMILIO FERRERO
Apoderado
APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING

Oficio N°
06358

ASUNTO:	Radicación N°	02-79394
	Solicitud internacional	PCT/IL2001/00216
	Fecha inicio fase nacional	13/10/2002
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- ☐ La solicitud no contiene la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT).
- ☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486).
- ☐ La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
- ☐

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

8 AGO 2003

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.