

CAVELIER

ABOGADOS

www.caveller.com
caveller@caveller.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

274
Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 540 0860
Fax in U.S.A.: (1-305) 381 9660

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 02-079394- -00011-0000

Fecha: 2007-11-19 16:47:26 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 444 RESP ESTAREQUE Folios: 20

Trámite : 011 Evento : 379 Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 02.079.394
Asunto : Solicitud de patente para **ANTICUERPOS
MONOCLONALES AL RECEPTOR LDL HUMANO, SU
PRODUCCIÓN Y USO**
Solicitante : APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V.
Fecha de Solicitud : 5 de septiembre de 2002

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al Oficio No. **10210** notificado por fijación en lista del 24 de agosto de 2007.

2. Mediante el Oficio No. **10210** se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente.

Atiendo a las observaciones de la manera siguiente:

2.1. CLARIDAD DE LA SOLICITUD Y UNIDAD DE INVENCION

Para subsanar las objeciones que sobre claridad y unidad de invención que hizo su Despacho, presento nuevo pliego reivindicatorio con 9 reivindicaciones en el cual se han hecho los cambios sugeridos por su Despacho, que permiten identificar con claridad el

objeto de la presente invención. Para estos efectos, se han efectuado las siguientes modificaciones en el capítulo reivindicatorio:

- El anticuerpo reivindicado en la nueva reivindicación 1 se caracteriza por una característica estructural, es decir, que el mismo pertenece al isótopo de inmunoglobulina **IgG₁** o IgM. Esta característica implica que el anticuerpo reivindicado comprende: (i) una cadena pesada γ 1 caracterizada por tener tres dominios constantes y una región de pivote específica, enlaces disulfuro y pliegues; o (ii) una cadena pesada μ caracterizada por tener cuatro dominios constantes y una región de pivote particular, enlaces disulfuro y pliegues.

A este respecto, ponemos de presente que cada ^{isótopo} isótopo de anticuerpo (por ejemplo el IgG₁) tiene características únicas que le posibilitan ser distinguibles de otros isótopos (por ejemplo IgA₁, IgA₂, IgE, IgG₃, IgC₄ e IgM).

Adicionalmente, la nueva reivindicación 1 establece que el anticuerpo reivindicado se expresa por uno de cinco clones de hibridoma específicos depositados en la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) bajo el Tratado de Budapest, y por lo tanto, se debe notar que la declaración del Examinador "[...] cualquier anticuerpo que se une a LDLR afectaría la novedad de la presente invención" ya no es aplicable.

- Con respecto a las reivindicaciones previas 2 a 6 y 8 a 12, nuevas reivindicaciones 1 a 6, respetuosamente ponemos de presente que, los anticuerpos de la presente invención comparten las siguientes características en común: (i) todos se obtuvieron utilizando un antígeno humano receptor LDL soluble altamente purificado; (ii) todos especifican el LDL humano soluble; y (iii) todos son capaces de inhibir la replicación del virus de la hepatitis C.

} características

A este respecto, es importante señalar que el **antígeno receptor humano LDL soluble altamente purificado** no era obvio en el momento en que se desarrollo la

presente invención y corresponde a una nueva calidad para antígenos (es decir, epítopos tridimensionales) utilizados para producir los anticuerpos LDLR y permiten la producción de anticuerpos específicos para el LDLR humano soluble.

En vista de lo anterior, existe un concepto común inventivo entre los anticuerpos reivindicados, es decir, **el antígeno utilizado para su producción**, que permite obtener anticuerpos que reconocen específicamente LDLR humano soluble y son capaces de inhibir la replicación del virus de la hepatitis C.

Adicionalmente, ponemos de presente que los clones del hibridoma (reivindicados en las nuevas reivindicaciones 2 a 6) se obtienen a través de un proceso que involucra la inmunización del mamífero con un **antígeno humano LDLR soluble altamente purificado**. Por lo tanto, teniendo en cuenta que dichos clones suministran la expresión de los anticuerpos reivindicados, existe un concepto común inventivo entre ellos y los clones de los anticuerpos reivindicados.

- La nueva reivindicación 7, derivada de la reivindicación previa 13, se refiere a un método para preparar el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, y la nueva reivindicación 8, derivada de la reivindicación previa 14, se refiere a un método para purificar el LDLR humano al utilizar el anticuerpo monoclonal de acuerdo a la reivindicación 1.

De esta manera es claro que con las anteriores modificaciones del capítulo reivindicatorio quedan subsanadas las objeciones que por claridad y por unidad de invención hizo su Despacho, ya que ahora, dicho pliego involucra un único concepto inventivo, reivindica productos en los términos sugeridos por su Despacho y permite determinar el alcance de la protección reivindicada y compararla frente al estado del arte, de acuerdo con las disposiciones de los artículos 30 y 25 de la Decisión 486.

2.2. NOVEDAD Y NIVEL INVENTIVO

Ese Despacho afirma que los documentos **D1 a D3** afectan la novedad y el nivel inventivo de las reivindicaciones 1 a 15 de la presente invención, con lo cual estamos en desacuerdo por los argumentos expuestos a continuación. Veamos:

Inicialmente, porque resulta un contrasentido que bajo el acápite de NOVEDAD se indique que D1 a D3 revelan las mismas características técnicas de la presente invención pero que a renglón seguido se concluya, bajo el acápite de NIVEL INVENTIVO, que la solución dada por D1 a D3 hubiera sido ensayada por un técnico medio para llegar a la solución propuesta en la presente invención. Lo anterior, por cuanto bajo novedad se habla de identidad en la solución pero bajo nivel inventivo se habla de obviedad de la misma, sin tener estos conceptos la misma significación.

cuando
no es
nuevo =
no es
inventivo

A este respecto, ponemos de presente que la presente invención enseña y reivindica, en la nueva reivindicación 1, anticuerpos que: (i) pertenecen al isótopo de inmunoglobulina IgG₁ o IgM; (ii) reconocen específicamente el receptor humano LDL soluble (LDLR); (iii) son capaces de inhibir la replicación del virus de la hepatitis C; y (iv) se expresan mediante clones de hibridoma específicos y depositados.

Adicionalmente, el nuevo grupo de reivindicaciones también cubre los clones de hibridoma y el método para producir dichos anticuerpos, un método para purificar el LDLR humano utilizando dichos anticuerpos y un método *in vitro* para inhibir la replicación del virus de la hepatitis C que utiliza dichos anticuerpos.

2.2.1. Novedad

D1 describe el uso de los anticuerpos monoclonales C7, 15C8, HL1 y 4A4, todos dirigidos contra el receptor LDL humano, en un ensayo de unión de ligando de fase sólida. A este respecto, es elemental señal que:

- el anticuerpo C7 tiene una reacción débilmente cruzada con el receptor LDL humano (ver página 3 líneas 11-16 de la solicitud PCT original) y éste reconoce un epítipo del receptor LDL humano (ver Fig. 1 en la página 9534 de D1) diferente de aquellos reconocidos por los anticuerpos descritos en la presente solicitud (ver Anexo 4.4.);
- el anticuerpo 15C8 se produce utilizando un péptido corto del receptor LDL de bovino (ver referencia [8] de D1; Anexo 4.5.) y ésta reconoce un epítipo similar a aquel reconocido por C7 (ver Fig. 1 en la página 9534 de D1);
- el anticuerpo HL1 se produce utilizando un péptido sintético que corresponde a los residuos 163-174, un ligador de aminoácido entre las repeticiones 4 y 5 del receptor LDL humano; el anticuerpo 4A4 se produce utilizando una secuencia de péptido corta del receptor LDL humano proveniente del terminal C del receptor, no presente en la forma del receptor soluble (ver Anexo 4.5.), de esta forma éste no se une a la forma humana del receptor LDL soluble.

D1, por lo tanto, no enseña anticuerpos que tengan las mismas características de los anticuerpos reivindicados en la presente invención ni describe anticuerpos que reconocen los mismos epítipos de los anticuerpos reivindicados. *no es posible establecerlo sin la estructura.*

D2 describe que la endocitosis del virus de la hepatitis C es mediada por los receptores LDL en células cultivadas. En los estudios presentados en este documento, el anticuerpo monoclonal C7, es decir, un anticuerpo no específico para el receptor humano LDL soluble, se mostró capaz de inhibir dicha endocitosis. *claro que es específico*

D2, por lo tanto, tampoco enseña anticuerpos que tengan las mismas características de los anticuerpos reivindicados en la presente invención ni describe anticuerpos capaces de inhibir la replicación del virus de la hepatitis C.

D3 describe el papel del dominio citoplasmático del receptor LDL en auto-asociación en los oligómeros. Los anticuerpos monoclonales anti-LDLR utilizados en este estudio corresponden a los anticuerpos C7, 15C8 y HL1 ya descritos bajo D.3.1 en relación con el documento D1.

Por lo tanto, como D1, D3 no enseña anticuerpos que tengan las mismas características de los anticuerpos reivindicados en la presente invención ni describe anticuerpos que reconocen los mismos epítopos de los anticuerpos reivindicados.

es mchala

Así entonces es claro que D1, D2 y D3 no anticipan todas las características técnicas de la invención reivindicada por mi representada. Por lo tanto, se puede concluir que dichos documentos no afectan la novedad de la presente solicitud.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que el producto es nuevo; se puede afirmar que los métodos de las reivindicaciones 7 y 8 también son novedosos, toda vez que los mismos llevan inevitablemente a la elaboración o empleo de dicho producto.

2.2.2. Nivel inventivo

Por otra parte, los anticuerpos de la presente solicitud representan una solución alternativa a un problema conocido, es decir, el suministro de anticuerpos contra el receptor humano LDL soluble, de una manera nueva, no obvia, en comparación con los anticuerpos de la técnica anterior: los anticuerpos de la presente solicitud se obtienen utilizando un antígeno receptor humano LDL soluble altamente purificado, es decir, epítopos tridimensionales (ver páginas 5 y 6 y ejemplo 1 de la solicitud), cuyo antígeno representa una nueva calidad para los antígenos utilizados para producir los anticuerpos LDLR y da como resultado anticuerpos específicos para LDLR soluble humanos, mientras que los anticuerpos de la técnica anterior se produjeron utilizando o un LDLR parcialmente purificado o péptidos sintéticos cortos del receptor LDL (ver D1 y D3).

como
evaluación
diferencias

Por lo cual, la contribución al estado del arte por parte de la presente invención es suministrar un protocolo purificante para suministrar cantidades suficientes del altamente purificado, es decir, bajo las condiciones de HPLC, el LDLR soluble humano (ver Ejemplo 1, particularmente último párrafo de la página 35 de la solicitud). Este nuevo proceso de purificación abrió la puerta para obtener anticuerpos específicos para los dominios de unión del ligando LDLR soluble humano (ver mapeo del epítipo del Anexo 4.4.).

Así entonces, se debe notar que la persona experta no tenía motivación a ensayar el "LDLR+291" soluble humano (es decir, la forma del receptor soluble humano que incluye la secuencia de amino ácido del Asp+4 a Glu+291 de la secuencia LDLR soluble humana) como un antígeno para generar los anticuerpos monoclonales (ver nueva reivindicación 7), toda vez que de acuerdo con la enseñanza en el campo (ver Anexo 4.5., en particular página 17448, columna de la izquierda) los anticuerpos contra el dominio de unión del ligando, es decir, las regiones más expuestas del receptor LDL humano soluble, son difíciles de obtener.

Por lo tanto, ninguno de los documentos de la técnica anterior (es decir, D1 a D3) solos o en combinación sugieren la materia objeto del nuevo conjunto de reivindicaciones, y por lo tanto, que dichos documento no afectan el nivel inventivo de la presente solicitud.

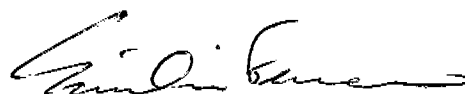
3. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

4. Anexos:

4.1. Nuevo pliego reivindicatorio con 9 reivindicaciones;

- 4.2. Formulario para modificaciones;
- 4.3. Recibo por valor de \$99.000 por concepto de modificaciones en solicitud pendiente.
- 4.4. Información Adicional en Mapeo Epítipo.
- 4.5. IR van Driel, JL Goldstein, TC Sudhof, and MS Brown, **"First cysteine-rich repeat in ligand-binding domain of low density lipoprotein receptor binds Ca²⁺ and monoclonal antibodies, but not lipoproteins"**. J. Biol. Chem., Dec 1987; 262: 17443 – 17449.

Bogotá,
Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

COLO-13414-841-001-9
NNJ\NNJ\ID-112604\WPC13414
No. M-2007-112604\NNJ

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1	SOLICITUD DE: ☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud	
2 SOLICITANTE	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 Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70 E-mail: clientes@cavelier.com	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: Emilio FERRERO Dirección: Carrera 4ª No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11 E-mail: cavelier@cavelier.com	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: <u>438.019 TP 31.929</u>
4	Número de expediente: <u>02.079.394</u>	
5	Descripción de la corrección o modificación solicitada: Presento nuevo pliego reivindicatorio compuesto por 9 reivindicaciones con el fin de superar las objeciones presentadas por Su Despacho respecto de la Claridad, Unidad de Invención, Novedad y Nivel Inventivo de la presente Solicitud y pido que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.	
6	Comprobante de pago No. _____ Fecha: _____	
7	Anexos ☒ Comprobante de pago de la tasa por \$99.000.00 por concepto de modificaciones. ☐ Poderes, si fuere el caso ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.	
8	NOMBRE: EMILIO FERRERO FIRMA:  C.C. 438.019 de Usaquén T.P.A. 31.929	

NNJ

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo monoclonal, anticuerpo quimérico, anticuerpo completamente humanizado, anticuerpo anti-anti-ID o fragmento de éste que pertenece al isótopo de inmunoglobulina IgG₁ o IgM, que reconoce y se une específicamente al receptor de lipoproteína de baja densidad soluble humano (LDLR) y a fragmentos de éste, que es capaz de inhibir la replicación del virus de la hepatitis C, y que se expresa por uno de los siguientes clones de hibridoma.
 - a) el clon de hibridoma 12.6 depositado en la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) bajo el No. 1-2390;
 - b) el clon de hibridoma 28 depositado en el CNCM bajo el No. 1-2391;
 - c) el clon de hibridoma 29.8 depositado en el CNCM bajo el No. 1-2392;
 - d) el clon de hibridoma 30 depositado en el CNCM bajo el No. 1-2393; o
 - e) el clon de hibridoma 50.30 depositado en el CNCM bajo el No. 1-2394;
2. Un clon de hibridoma 12.6 depositado en el CNCM bajo el No. 1-2390.
3. Un clon de hibridoma 28 depositado en el CNCM bajo el No. 1-2391.
4. Un clon de hibridoma 29.8 depositado en el CNCM bajo el No. 1-2392.
5. Un clon de hibridoma 30 depositado en el CNCM bajo el No. 1-2393.
6. Un clon de hibridoma 50.30 depositado en el CNCM bajo el No. 1-2394.
7. Un método para preparar el anticuerpo monoclonal de acuerdo a la reivindicación 1 que comprende hacer crecer un hibridoma clonado que comprende una célula de vaso proveniente de un mamífero inmunizado con un LDLR+291 soluble humano altamente purificado, es decir, la forma del receptor soluble humana que incluye la secuencia de amino ácido de la Asp+4 a la Glu+291 de la secuencia LDLR soluble humana, y una célula linfoide homogénea o heterogénea en un medio líquido o en el abdomen de un mamífero para permitirle al hibridoma producir y acumular dicho anticuerpo monoclonal.

284

8. Un método para purificar el LDLR humano, que comprende poner en contacto un material que contiene el LDLR humano crudo con el anticuerpo monoclonal de acuerdo a la reivindicación 1.
9. Un método *in vitro* para inhibir la replicación del virus de la hepatitis C, que comprende poner en contacto las células con el anticuerpo monoclonal de acuerdo a la reivindicación 1 antes de la infección por el virus de la hepatitis C para inhibir la replicación de la hepatitis C en las células.

TABLE I
Metabolism at 37 °C of ^{125} I- β -VLDL and ^{125} I-IgG-15C8 in cells transfected with pDLR1

On day 4 of cell growth, cells expressing the indicated cDNA received 2 ml of warm Eagle's minimum medium (GIBCO) supplemented with 5% human lipoprotein-deficient serum and one of the indicated ^{125} I-ligands: 10 μ g of protein/ml of ^{125} I- β -VLDL (267 cpm/ng protein) in the absence or presence of 1 mg of protein/ml of unlabeled β -VLDL or 10 μ g/ml ^{125} I-IgG-15C8 (339 cpm/ng) in the absence or presence of 1 mg/ml unlabeled IgG-15C8. After incubation for 5 h at 37 °C, the total amounts of surface-bound, internalized, and degraded ^{125} I-ligand were determined. High affinity values were calculated by subtracting the values obtained in the presence of unlabeled ligand from the values obtained in the absence of unlabeled ligand. Each value represents the mean of duplicate incubations.

Transfected cDNA	^{125} I- β -VLDL			^{125} I-IgG-15C8	
	Surface-bound	Internalized	Degraded	Surface-bound + internalized	Degraded
	ng/mg	ng/mg	ng $\cdot$ 5 h $^{-1}$ $\cdot$ mg $^{-1}$	ng/mg	ng $\cdot$ 5 h $^{-1}$ $\cdot$ mg $^{-1}$
pDLR-2	127	826	3438	104	553
pAR1	192	824	3048	0	0

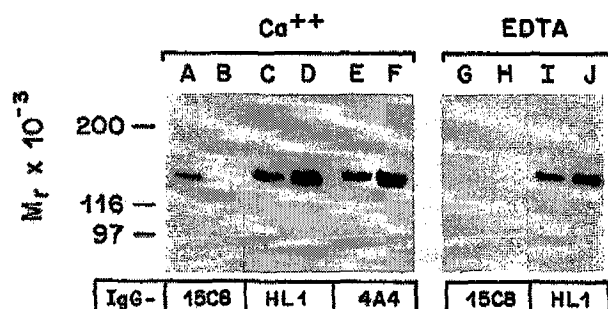


FIG. 5. Immunoblotting of solubilized LDL receptors from transfected cells. Detergent-solubilized extracts of cells transfected with pDLR-2 (A, C, E, G, I) or pAR1 (B, D, F, H, J) were subjected to electrophoresis on a 6% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes and incubated with the indicated mouse monoclonal antireceptor antibodies in the presence of either 2 mM CaCl₂ or 10 mM EDTA as indicated. The membranes were then probed with 3×10^6 cpm/ml ^{125} I-labeled rabbit anti-mouse IgG (10 ^{4} cpm/ng). The nitrocellulose was exposed to RP-1 film for 2 h at room temperature with an intensifying screen. The migration of molecular weight markers is shown.

First Repeat Binds Antibodies but Not Lipoproteins—We next prepared a plasmid containing a cDNA from which the entire external domain of the LDL receptor was deleted except for the first repeat (amino acids 2–42) plus 17 amino acids immediately external to the membrane. This plasmid, designated pR1, was predicted to produce a small protein with an apparent molecular weight of ~16,000. When cells were pulse-labeled with [^{35} S]cysteine and then subjected to immunoprecipitation with a rabbit polyclonal anti-COOH-terminal antibody, the normal receptor encoded by pDLR-2 appeared as a 120,000-D precursor that was rapidly processed to the 160,000-Da mature form (left lane of Fig. 6). The receptor was stable for 4 h, but after a 16-h chase, most of the receptors were destroyed. The receptor encoded by pR1 was also precipitated by the rabbit anti-COOH-terminal antibody (right panel of Fig. 6). This receptor was synthesized as an M_r 16,000 precursor that did not undergo any increase in apparent molecular weight, indicating that this protein does not serve as an acceptor for oligosaccharide moieties. The receptor had approximately the same stability as the normal receptor. It was intact at 4 h, but was degraded 16 h after synthesis.

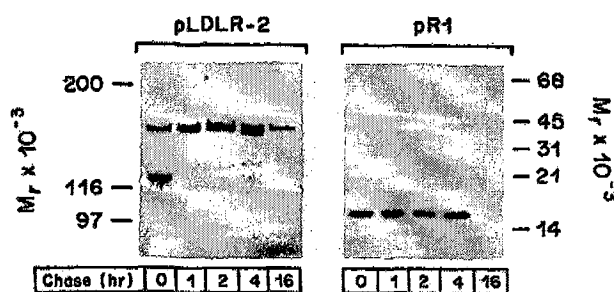


FIG. 6. Biosynthesis of ^{35} S-labeled LDL receptors in cells transfected with pDLR-2 and pR1. Cells transfected with the indicated plasmid were pulse-labeled for 1 h with 0.5 mCi of [^{35} S]cysteine in cysteine-free Dulbecco's modified Eagle's medium containing 0.3 mM L-proline and 10% lipoprotein-deficient serum, followed by a chase for the indicated time in medium A containing 10% lipoprotein-deficient serum. Receptors were immunoprecipitated from detergent lysates with a rabbit anti-COOH-terminal antibody, reduced with 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, and subjected to electrophoresis on either a 6% (pDLR-2) or a 10% (pR1) SDS-polyacrylamide gel. The migration of molecular weight markers is shown. Gels were treated with Amplify (Amersham Corp.), dried, and exposed to XAR-5 film for 16 h at -70 °C.

At 4 °C cells expressing the receptor encoded by pR1 bound ^{125} I-IgG-C7 but not ^{125} I-LDL or ^{125} I- β -VLDL (Fig. 7). The amount of binding of ^{125} I-IgG-C7 to the cells expressing the mutant receptor was about half the amount that was bound to the cells expressing the normal receptor cDNA. This ratio was variable from experiment to experiment; in other experiments the amount of ^{125} I-IgG-C7 binding was the same in the two transfected cell lines. The apparent affinity for ^{125} I-IgG-C7 was not significantly affected by the deletion (Fig. 7A).

Binding of IgG-C7 and IgG-15C8 has previously been shown to be Ca²⁺-dependent on immunoblots after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (see Fig. 5) as well as in intact cells.³ Cells expressing the receptor encoded by pR1 showed the same Ca²⁺ requirement for binding ^{125} I-IgG-C7 as did the normal receptor (Fig. 8).

At 37 °C the receptor encoded by pR1 bound ^{125} I-IgG-15C8 normally, but internalization and degradation of the bound antibody were sluggish. Fig. 9 shows an experiment in which cells expressing pDLR-2 and pR1 were incubated with ^{125} I-IgG-15C8 at 37 °C. After various times, the medium was removed for measurement of trichloroacetic acid-soluble degradation products, the cells were washed, and the amount of ^{125} I-IgG-15C8 releasable by trypsin was determined and used as a measure of surface-bound antibody. The material that was resistant to trypsin release is considered to be intracellular. In the steady state the pDLR-2 cells contained nearly 3 times more antibody inside the cell than was bound at the surface. The dynamic nature of this steady state was revealed by the progressive increase in trichloroacetic acid-soluble radioactivity which reflects ongoing binding, internalization, and degradation. After 5 h the internalization index, defined as the sum of internalized plus degraded antibody divided by the amount of surface-bound antibody (13), was 17. This indicates that each receptor had cycled into and out of the cell approximately 17 times during the 5-h period. In the cells expressing pR1, the amount of surface binding was higher than in the normal cells (Fig. 9B). The amount of internalized ^{125} I-IgG-15C8 rose rapidly but reached a plateau level that was no higher than the level of surface binding. The amount

³ W. J. Schneider, J. L. Goldstein, and M. S. Brown, unpublished observations.

First Cysteine-rich Repeat in Ligand-binding Domain of Low Density Lipoprotein Receptor Binds Ca^{2+} and Monoclonal Antibodies, but Not Lipoproteins*

(Received for publication, August 17, 1987)

Ian R. van Driel^{‡§}, Joseph L. Goldstein[‡], Thomas C. Südhof^{¶¶}, and Michael S. Brown[‡]

From the Departments of [‡]Molecular Genetics and Internal Medicine and ^{¶¶}Howard Hughes Medical Institute, University of Texas Health Science Center at Dallas, Southwestern Medical School, Dallas, Texas 75235

The ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor consists of seven cysteine-rich repeats of ~40 amino acids each. These repeats, which are located at the NH_2 terminus of the protein, are homologous to sequences in complement components C8 and C9. To determine the role of the first repeat (amino acids 2-42), we prepared two plasmids containing expressible low density lipoprotein receptor cDNAs. The first plasmid, pAR1, lacks only the nucleotides encoding the first repeat. It produced a receptor that bound and internalized lipoproteins and recycled to the cell surface with the same efficiency as the normal receptor. This deleted receptor failed to bind two monoclonal antibodies, IgG-C7 and IgG-15C8, which were shown previously to react with the ligand-binding domain. The second plasmid, pR1, encodes a markedly truncated protein whose extracellular domain consists of the first repeat joined to the transmembrane and cytoplasmic domains. This protein bound the two monoclonal antibodies with the same affinity as the normal receptor, but failed to bind lipoproteins. Binding of IgG-15C8 to the normal receptor and the pR1-encoded protein was Ca^{2+} -dependent, indicating that the first repeat binds Ca^{2+} . We conclude that repeats 2-6 in the ligand-binding domain are sufficient for binding lipoproteins and that the first repeat is highly immunogenic, but is not required for lipoprotein binding.

The low density lipoprotein (LDL)¹ receptor is a recycling cell surface protein that mediates the uptake of cholesterol-carrying lipoproteins in coated pits (1). The receptor is a single-chain transmembrane glycoprotein with five modular domains. These domains are encoded by 18 exons, many of whose borders coincide with the structural and functional limits of the domains (1). The exons corresponding to each of these domains have been deleted, either by naturally occurring human mutations (2-4) or through *in vitro* mutagenesis of an expressible cDNA (5, 6).² These deletions abolish the function

normally performed by that domain, but leave the other functions of the receptor intact. This deletional analysis has allowed the function of each domain to be assigned.

The first domain of the LDL receptor consists of 292 amino acids at the NH_2 terminus, which is located outside the cell membrane. This domain is composed of seven copies of an imperfect repeat of a ~40-amino acid cysteine-rich sequence (1). This domain contains binding sites for two proteins, apoprotein (apo) B-100 and apoE, which are the active components of LDL and β -migrating very low density lipoprotein (β -VLDL), two lipoprotein ligands for the receptor (3).² The cysteine-rich repeats are closely related to a 40-amino acid, cysteine-rich sequence found in several proteins of the blood complement system, namely C8 α , C8 β , and C9 (1, 7, 8). This structural motif occurs only once in each of the complement components and its function is unknown. The second domain in the LDL receptor consists of 400 amino acids that are homologous to a sequence in the precursor for epidermal growth factor, a peptide hormone. This sequence includes three copies of a 40-amino acid cysteine-rich repeat that differs from the repeat unit in the binding domain. This "growth factor" repeat has been found in more than a dozen extracellular proteins, including proteases of the blood coagulation system, components of complement, cell surface receptors, viral proteins, and differentiation-associated proteins in invertebrates (6, 9). When the growth factor homology domain is deleted from the LDL receptor, the receptor loses the ability to discharge its ligand at acid pH, and concomitantly the receptor shows a diminished ability to leave the endosome and recycle to the surface after internalization (6). The third domain, located on the external surface near the plasma membrane, is a region of 58 amino acids that is rich in serine and threonine residues, which serve as the sites of attachment for clustered O-linked sugars. Deletion of this domain does not affect the function of the receptor in cultured fibroblasts (5).

The fourth domain of the LDL receptor is a 22-amino acid hydrophobic sequence that spans the membrane and anchors the protein in the lipid bilayer (1, 2, 10). The fifth domain is a 50-amino acid sequence, located at the COOH terminus, that penetrates into the cytoplasm (1). This domain plays a role in allowing the receptor to self-associate into dimers and higher order multimers (11). It also plays a crucial role in clustering of the receptor in coated pits, an event that is required for efficient internalization (4, 12, 13).

Previous studies of the LDL receptor have been facilitated by the availability of monoclonal antibodies that were raised by immunizing mice with the receptor purified from bovine adrenal cortex. Two monoclonal antibodies, designated IgG-C7 (14) and IgG-15C8 (15), have been of particular impor-

* This work was supported by Research Grant HL 20948 from the National Institutes of Health. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Recipient of a C. J. Martin Fellowship of the National Health and Medical Research Council of Australia.

¹ The abbreviations used are: LDL, low density lipoprotein; β -VLDL, β -migrating very low density lipoprotein; apo, apoprotein; SDS, sodium dodecyl sulfate; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.

² L. Limbird, V. Esser, J. L. Goldstein, M. S. Brown, and D. W. Russell, manuscript in preparation.

287

tance. These antibodies are thought to bind to the ligand-binding domain of the LDL receptor since they partially block the binding of LDL. Moreover, these antibodies react with mutant receptors that lack either the O-linked sugar region (5) or the epidermal growth factor precursor homology region (6). The precise sequence within the ligand-binding domain that is recognized is not known.

In the current studies we have sought to functionally dissect the ligand-binding domain by deleting the exon that encodes the first 40-amino acid cysteine-rich repeat. When this repeat was deleted, the receptor lost the ability to bind the antireceptor monoclonal antibodies IgG-C7 and IgG-15C8, but it retained the ability to bind apoB-100 and apoE-containing lipoproteins. We have also prepared a severely deleted receptor in which the first cysteine-rich repeat is essentially the only remaining external sequence. This receptor binds the two monoclonal antibodies and undergoes slow internalization, but it does not bind lipoproteins. The antibody binding to this truncated receptor showed an absolute dependence on Ca^{2+} , indicating that the first repeat of the LDL receptor contains a Ca^{2+} -binding site.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials.—Human LDL (d 1.019–1.063 g/ml) (16) and rabbit β -VLDL (d < 1.006 g/ml) (17) were prepared by ultracentrifugation and radiolabeled by the iodine monochloride method. Lipoprotein-deficient serum (d > 1.215 g/ml) was prepared as described (16). Oligonucleotides were synthesized with an automated DNA synthesizer (model 380A, Applied Biosystems, Inc.). *ldla*-7 cells, a Chinese hamster ovary cell mutant lacking a functional LDL receptor (18), were obtained from Monty Krieger (Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA). A synthetic peptide corresponding to the COOH-terminal 14 amino acids of the human LDL receptor was prepared as previously described (15).

Antibodies.—Mouse monoclonal antibodies IgG-C7 (14), IgG-15C8 (15), and IgG-HL1 (11) directed against the LDL receptor were prepared as described in the indicated reference. A control mouse monoclonal, IgG-2001, is directed against an irrelevant antigen (19). IgG-4A4 is a mouse monoclonal antibody directed against a synthetic peptide corresponding to the COOH-terminal 14 amino acids of the human LDL receptor. A hybridoma producing this antibody was prepared by fusion of popliteal lymph nodes from immunized mice to NS1/1 Ag 4.1 myeloma cells as described (11, 20). The heavy chain of IgG-4A4 is IgG₁, and the light chain is κ . The rabbit polyclonal antibody directed against the COOH-terminal 14 amino acids of the human LDL receptor has been previously described (15). All antibodies were purified from mouse ascites fluid or rabbit serum by affinity chromatography on *Staphylococcus* protein A-Sepharose (14). Monoclonal antibodies were radiolabeled with ^{125}I as previously described (14).

Plasmids and Transfected Cell Lines.—pLDLR-2, a plasmid containing a cDNA encoding the human LDL receptor under the control of the SV40 early promoter (21), and TR-715, a stable line of hamster *ldla*-7 cells that were transfected with pLDLR-2, have been described previously (5). pR1 encodes a truncated LDL receptor cDNA in which the first repeat of the ligand-binding domain (amino acids 1–42) is attached via four foreign amino acids (Gly-Thr-Arg-Ser) to the COOH-terminal 89 amino acids consisting of the 17 amino acids immediately above the membrane, the 22 amino acids of the membrane-spanning domain and the 50 amino acids of the cytoplasmic domain (amino acids 751–839). This plasmid was constructed by standard procedures (22) from two plasmids (pAX3-6 and pSTC) derived from pLDLR-2. pAX3-6 was constructed by deleting the DNA-encoding amino acids 43–292 of the LDL receptor and introducing a *KpnI* recognition sequence immediately 3' to the deletion site. This was achieved using a single 48-mer oligonucleotide that bridged the deletion site. pSTC was constructed by deleting the DNA-encoding amino acids 5–749 of the LDL receptor and introducing a *BglII* recognition sequence that bridged the deletion site. To facilitate the introduction of the *BglII* recognition sequence, the codon for Ala-750 of the LDL receptor (GCT) was changed to TCT (Ser) by using a single 45-mer oligonucleotide. To construct pR1, the 234-base pair *XbaI*-*KpnI* fragment of pAX3-6, the 5523-base pair *XbaI*-*BglII* fragment of pSTC, and a 5'-phosphorylated oligonucleotide 5'-

GATCTGGTAC-3' were ligated together. The oligonucleotide was included to partially link the noncomplementary *BglII* and *KpnI* ends. The product of the ligation had two bases unpaired, which were filled using the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I.

pAR1 encodes a truncated LDL receptor from which the first repeat of the ligand-binding domain (amino acids 2–42) was deleted. This plasmid was constructed by deleting DNA corresponding to exon 2 of the LDL receptor from pLDLR-2 (21, 23), using oligonucleotide-directed mutagenesis (24).

The constructs pR1 and pAR1 were used to transform *E. coli* TG-1, after which they were characterized by DNA sequencing and transfected into *ldla*-7 cells as described (5). Stable cell lines were selected by indirect immunofluorescence with monoclonal antireceptor IgG-C7. The cell lines transfected with pR1 and pAR1 are designated TR-1011-25 and TR-864-1 cells, respectively. All cell lines were maintained in monolayer culture at 37 °C in an atmosphere of 5–7% CO_2 .

LDL Receptor Assays.—For assays of LDL receptor activity, 4×10^4 cells from trypsinized stock cultures were seeded into 60-mm Petri dishes in medium A (Ham's F-12 medium containing 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin sulfate) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (day 0). On day 2, cells were refed with medium of identical composition. On the day prior to experiments (day 3), cells received medium A supplemented with 10% calf lipoprotein-deficient serum, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 25-hydroxycholesterol, and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cholesterol. The sterols were added to suppress any endogenous defective hamster LDL receptors (5). Experiments were performed on day 4. Cell surface binding of ^{125}I -LDL, ^{125}I - β -VLDL, and ^{125}I -labeled antireceptor monoclonal antibodies by monolayers at 4 °C was determined as described previously (14, 16). Metabolism of ^{125}I -ligands by monolayers at 37 °C was determined as previously described (16). Surface-bound and internalized ^{125}I -LDL were separately measured by the dextran-sulfate release technique (16). Surface-bound and internalized ^{125}I -IgG-15C8 were separately measured by a minor modification of the trypsin release technique (25).

Immunochemical Procedures.—Immunoblot analysis of proteins transferred to nitrocellulose membranes (11) and immunoprecipitation of LDL receptors from [^{35}S]cysteine-labeled cells (5) were performed as described.

Miscellaneous Methods.—SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed by the method of Laemmli (26). Samples did not receive reducing agent unless otherwise stated. Apparent molecular masses were calculated by reference to the migration of the following marker proteins: myosin (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (68 kDa), egg albumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), soybean trypsin inhibitor (21 kDa), and lysozyme (14 kDa). Marker proteins were always reduced with 3% (v/v) 2-mercaptoethanol prior to electrophoresis. Proteins were visualized by fluorography using Kodak X-Omat RP-1 or XAR-5 film and Du Pont Lightning Plus intensifying screens as stated in the figure legends.

RESULTS

Deletion of First Repeat Eliminates Binding of Monoclonal Antibodies but Not Lipoproteins.—Fig. 1 shows the binding of various ligands to hamster cells that were transfected with an expressible cDNA (pLDLR-2) encoding the normal human LDL receptor or a mutant cDNA (pAR1) encoding a receptor that lacks the first cysteine-rich repeat in the ligand-binding domain (amino acids 2–42). As recipients for the transfections we used mutant cells that do not express LDL receptors on their surface (18). At 4 °C the cells expressing the deleted receptor showed a normal ability to bind ^{125}I -LDL (Fig. 1A) and ^{125}I - β -VLDL (Fig. 1B), but no ability to bind ^{125}I -IgG-C7 with high affinity (Fig. 1C). IgG-C7 is one of the monoclonal antibodies that recognizes the ligand-binding domain. In other experiments, the receptor encoded by pAR1 again bound ^{125}I - β -VLDL normally at 4 °C (Fig. 2A), but did not bind ^{125}I -IgG-15C8 (Figs. 2B and 3A), the other monoclonal antibody that recognizes the ligand-binding domain.

The receptor encoded by pAR1 showed a normal affinity for ^{125}I -IgG-HL1 (Fig. 3B). This monoclonal antipeptide an-

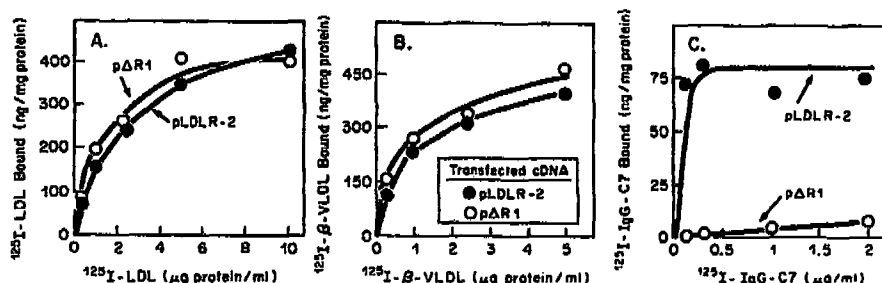


FIG. 1. Surface binding at 4 °C of ^{125}I -LDL (A), ^{125}I - β -VLDL (B), and ^{125}I -IgG-C7 (C) to monolayers of cells transfected with p Δ R1. On day 4 of cell growth, cells expressing the indicated cDNA received 1.5 ml of ice-cold medium B (Eagle's minimum essential medium without bicarbonate (GIBCO) containing 5% human lipoprotein-deficient serum and 20 mM HEPES at pH 7.4) and the indicated concentration of ^{125}I -LDL (401 cpm/ng protein), ^{125}I - β -VLDL (257 cpm/ng protein), or ^{125}I -IgG-C7 (601 cpm/ng). After 2 h at 4 °C, the total radioactivity bound to the cells was determined. Each value represents the average of duplicate incubations.

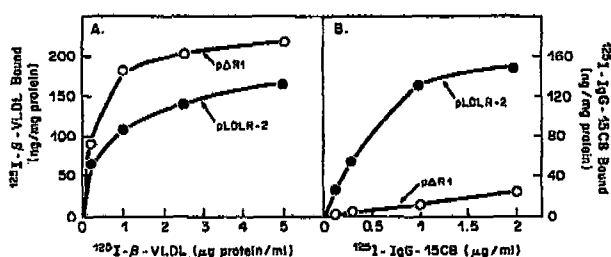


FIG. 2. Surface binding at 4 °C of ^{125}I - β -VLDL (A) and ^{125}I -IgG-15C8 (B) to monolayers of cells transfected with p Δ R1. On day 4 of cell growth, cells expressing the indicated cDNA received 1.5 ml of ice-cold medium B and the indicated concentration of ^{125}I - β -VLDL (251 cpm/ng protein) or ^{125}I -IgG-15C8 (620 cpm/ng). After 2 h at 4 °C, the total radioactivity bound to the cells was determined. Each value represents the average of duplicate incubations.

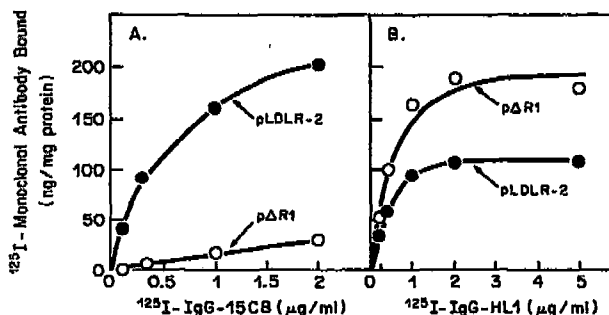


FIG. 3. Surface binding at 4 °C of ^{125}I -IgG-15C8 (A) and ^{125}I -IgG-HL1 (B) to monolayers of cells transfected with p Δ R1. On day 4 of cell growth, cells expressing the indicated cDNA received 1.5 ml of ice-cold medium B and the indicated concentration of ^{125}I -IgG-15C8 (610 cpm/ng) or ^{125}I -IgG-HL1 (434 cpm/ng). After 3 h at 4 °C, the total radioactivity bound to the cells was determined. Each value represents the average of duplicate determinations.

tibody was raised against a synthetic peptide corresponding to amino acids 163–174 in the ligand-binding domain (11). These amino acids constitute a linker between repeats 4 and 5 (23).

At 37 °C the receptor produced by p Δ R1 was able to mediate the binding (Fig. 4A), internalization (Fig. 4B), and lysosomal degradation (Fig. 4C) of ^{125}I -LDL with normal affinity. The deleted receptor was also able to mediate the binding, uptake, and degradation of ^{125}I - β -VLDL (Table I), but there was no binding, uptake, or degradation of ^{125}I -IgG-15C8 (Table I).

Fig. 5 shows a series of immunoblots of extracts from cells transfected with either the normal cDNA or p Δ R1. In the

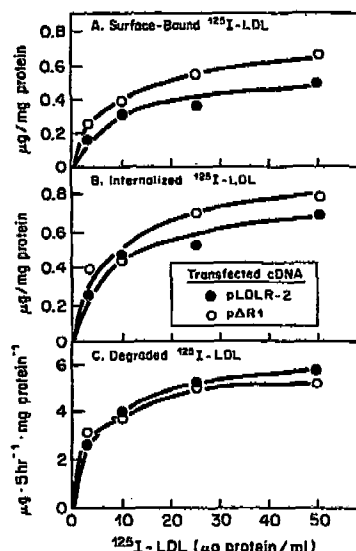


FIG. 4. Metabolism of ^{125}I -LDL at 37 °C by monolayers of cell transfected with p Δ R1 as a function of the concentration of ^{125}I -LDL. On day 4 of cell growth, cells expressing the indicated cDNA received 2 ml of warm minimum Eagle's medium (GIBCO) supplemented with 5% human lipoprotein-deficient serum and the indicated concentration of ^{125}I -LDL (79 cpm/ng protein) in the absence or presence of 1 mg of protein/ml of unlabeled LDL. After incubation for 5 h at 37 °C, the total amounts of surface-bound ^{125}I -LDL, internalized ^{125}I -LDL, and degraded ^{125}I -LDL were measured. The values shown represent high affinity values, which were determined by subtracting the values for ^{125}I -LDL in the presence of unlabeled LDL (nonspecific value) from that in its absence (total value). Each value represents the average of duplicate incubations.

presence of Ca^{2+} , the normal receptor bound IgG-15C8 (lane A), but the deleted receptor did not (lane B). Binding of IgG-15C8 to the normal receptor was abolished by EDTA (lane G). The deleted receptor and the normal receptor bound IgG-HL1, the antibody directed against the linker peptide (lanes C and D), and binding was not abolished by EDTA (lanes I and J). Both receptors also bound IgG-4A4, a monoclonal anti-peptide antibody directed against the COOH-terminal 14 amino acids of the cytoplasmic domain (lanes E and F).

The above data indicate that the first repeat of the ligand-binding domain is the site at which IgG-C7 and IgG-15C8 bind to the receptor, but that this repeat is not necessary for the binding of LDL or β -VLDL, nor is it necessary for internalization and recycling of LDL receptors.

289

TABLE I
Metabolism at 37 °C of ¹²⁵I-β-VLDL and ¹²⁵I-IgG-15C8 in cells transfected with pAR1

On day 4 of cell growth, cells expressing the indicated cDNA received 2 ml of warm Eagle's minimum medium (GIBCO) supplemented with 5% human lipoprotein-deficient serum and one of the indicated ¹²⁵I-ligands: 10 μg of protein/ml of ¹²⁵I-β-VLDL (267 cpm/ng protein) in the absence or presence of 1 mg of protein/ml of unlabeled β-VLDL or 10 μg/ml ¹²⁵I-IgG-15C8 (339 cpm/ng) in the absence or presence of 1 mg/ml unlabeled IgG-15C8. After incubation for 5 h at 37 °C, the total amounts of surface-bound, internalized, and degraded ¹²⁵I-ligand were determined. High affinity values were calculated by subtracting the values obtained in the presence of unlabeled ligand from the values obtained in the absence of unlabeled ligand. Each value represents the mean of duplicate incubations.

Transfected cDNA	¹²⁵ I-β-VLDL			¹²⁵ I-IgG-15C8	
	Surface-bound	Internalized	Degraded	Surface-bound + internalized	Degraded
	ng/mg	ng/mg	ng·5 h ⁻¹ ·mg ⁻¹	ng/mg	ng·5 h ⁻¹ ·mg ⁻¹
pDLR-2	127	826	3438	104	553
pAR1	192	824	3048	0	0

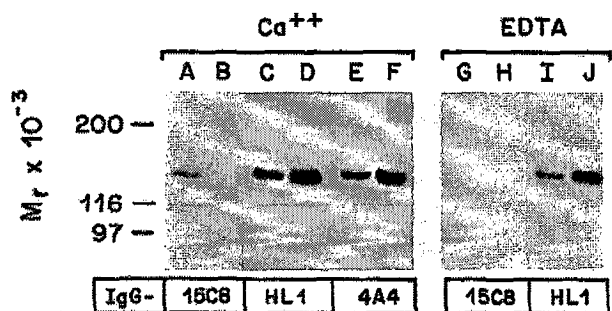


FIG. 5. Immunoblotting of solubilized LDL receptors from transfected cells. Detergent-solubilized extracts of cells transfected with pDLR-2 (A, C, E, G, I) or pAR1 (B, D, F, H, J) were subjected to electrophoresis on a 6% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes and incubated with the indicated mouse monoclonal antireceptor antibodies in the presence of either 2 mM CaCl₂ or 10 mM EDTA as indicated. The membranes were then probed with 3 × 10⁵ cpm/ml ¹²⁵I-labeled rabbit anti-mouse IgG (10⁴ cpm/ng). The nitrocellulose was exposed to RP-1 film for 2 h at room temperature with an intensifying screen. The migration of molecular weight markers is shown.

First Repeat Binds Antibodies but Not Lipoproteins—We next prepared a plasmid containing a cDNA from which the entire external domain of the LDL receptor was deleted except for the first repeat (amino acids 2–42) plus 17 amino acids immediately external to the membrane. This plasmid, designated pR1, was predicted to produce a small protein with an apparent molecular weight of ~16,000. When cells were pulse-labeled with [³⁵S]cysteine and then subjected to immunoprecipitation with a rabbit polyclonal anti-COOH-terminal antibody, the normal receptor encoded by pDLR-2 appeared as a 120,000-D precursor that was rapidly processed to the 160,000-Da mature form (left lane of Fig. 6). The receptor was stable for 4 h, but after a 16-h chase, most of the receptors were destroyed. The receptor encoded by pR1 was also precipitated by the rabbit anti-COOH-terminal antibody (right panel of Fig. 6). This receptor was synthesized as an M_r 16,000 precursor that did not undergo any increase in apparent molecular weight, indicating that this protein does not serve as an acceptor for oligosaccharide moieties. The receptor had approximately the same stability as the normal receptor. It was intact at 4 h, but was degraded 16 h after synthesis.

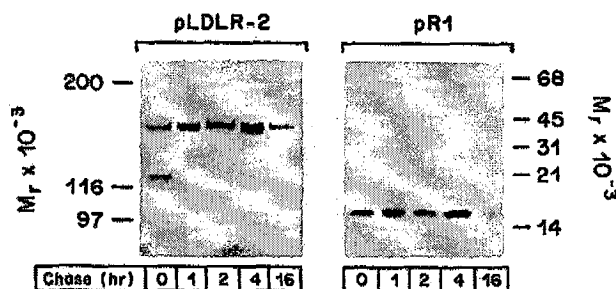


FIG. 6. Biosynthesis of ³⁵S-labeled LDL receptors in cells transfected with pDLR-2 and pR1. Cells transfected with the indicated plasmid were pulse-labeled for 1 h with 0.5 mCi of [³⁵S]cysteine in cysteine-free Dulbecco's modified Eagle's medium containing 0.3 mM L-proline and 10% lipoprotein-deficient serum, followed by a chase for the indicated time in medium A containing 10% lipoprotein-deficient serum. Receptors were immunoprecipitated from detergent lysates with a rabbit anti-COOH-terminal antibody, reduced with 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, and subjected to electrophoresis on either a 6% (pDLR-2) or a 10% (pR1) SDS-polyacrylamide gel. The migration of molecular weight markers is shown. Gels were treated with Amplify (Amersham Corp.), dried, and exposed to XAR-5 film for 16 h at -70 °C.

At 4 °C cells expressing the receptor encoded by pR1 bound ¹²⁵I-IgG-C7 but not ¹²⁵I-LDL or ¹²⁵I-β-VLDL (Fig. 7). The amount of binding of ¹²⁵I-IgG-C7 to the cells expressing the mutant receptor was about half the amount that was bound to the cells expressing the normal receptor cDNA. This ratio was variable from experiment to experiment; in other experiments the amount of ¹²⁵I-IgG-C7 binding was the same in the two transfected cell lines. The apparent affinity for ¹²⁵I-IgG-C7 was not significantly affected by the deletion (Fig. 7A).

Binding of IgG-C7 and IgG-15C8 has previously been shown to be Ca²⁺-dependent on immunoblots after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (see Fig. 5) as well as in intact cells.³ Cells expressing the receptor encoded by pR1 showed the same Ca²⁺ requirement for binding ¹²⁵I-IgG-C7 as did the normal receptor (Fig. 8).

At 37 °C the receptor encoded by pR1 bound ¹²⁵I-IgG-15C8 normally, but internalization and degradation of the bound antibody were sluggish. Fig. 9 shows an experiment in which cells expressing pDLR-2 and pR1 were incubated with ¹²⁵I-IgG-15C8 at 37 °C. After various times, the medium was removed for measurement of trichloroacetic acid-soluble degradation products, the cells were washed, and the amount of ¹²⁵I-IgG-15C8 releasable by trypsin was determined and used as a measure of surface-bound antibody. The material that was resistant to trypsin release is considered to be intracellular. In the steady state the pDLR-2 cells contained nearly 3 times more antibody inside the cell than was bound at the surface. The dynamic nature of this steady state was revealed by the progressive increase in trichloroacetic acid-soluble radioactivity which reflects ongoing binding, internalization, and degradation. After 5 h the internalization index, defined as the sum of internalized plus degraded antibody divided by the amount of surface-bound antibody (13), was 17. This indicates that each receptor had cycled into and out of the cell approximately 17 times during the 5-h period. In the cells expressing pR1, the amount of surface binding was higher than in the normal cells (Fig. 9B). The amount of internalized ¹²⁵I-IgG-15C8 rose rapidly but reached a plateau level that was no higher than the level of surface binding. The amount

³ W. J. Schneider, J. L. Goldstein, and M. S. Brown, unpublished observations.

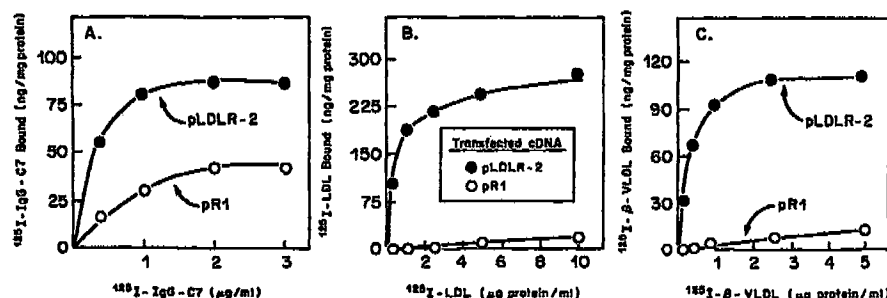


FIG. 7. Surface binding at 4 °C of ¹²⁵I-IgG-C7 (A), ¹²⁵I-LDL (B), and ¹²⁵I-β-VLDL (C) to monolayers of cells transfected with pR1. On day 4 of cell growth, cells expressing the indicated cDNA received 1.5 ml of ice-cold medium B and the indicated concentration of ¹²⁵I-IgG-C7 (738 cpm/ng), ¹²⁵I-LDL (328 cpm/ng protein), or ¹²⁵I-β-VLDL (305 cpm/ng protein). After 3 h at 4 °C, the total radioactivity bound to the cells was determined. Each value represents the average of duplicate incubations.

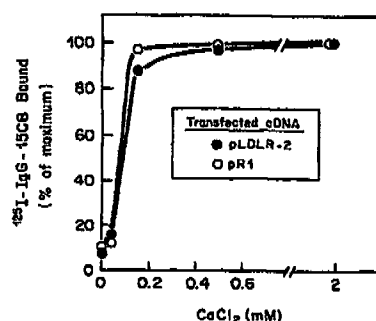


FIG. 8. Surface binding at 4 °C of ¹²⁵I-IgG-15C8 to monolayers of cells transfected with pR1 as a function of the concentration of Ca²⁺. On day 4 of cell growth, cells expressing the indicated cDNA were washed with 3 ml of ice-cold phosphate-buffered saline (Ca²⁺- and Mg²⁺-free) and then incubated with 1.5 ml of ice-cold phosphate-buffered saline supplemented with 5% human lipoprotein-deficient serum, 150 μM sodium EDTA (pH 7.4), 2 μg/ml ¹²⁵I-IgG-15C8 (618 cpm/ng), and the indicated concentration of CaCl₂. After incubation for 2 h at 4 °C, the total radioactivity bound to the cells was determined. Each value is the average of duplicate incubations. The "100% of maximum" values were 161 and 59 ng of ¹²⁵I-IgG-15C8 bound/mg of protein for cells transfected with pLDLR-2 and pR1, respectively.

of degradation was also much lower than expected, based on the amount of surface binding. The internalization index was 2.9, which was only one-sixth the normal.

To confirm the defective internalization and degradation in the pR1 cells, we incubated cells expressing the normal and deleted cDNAs with ¹²⁵I-IgG-15C8 at two different concentrations for 5 h (Fig. 10). As a control, we performed the same experiment with TR-718 cells, a stable line of receptor-negative hamster cells that had been transfected only with salmon sperm DNA. The values for binding, internalization, and degradation of ¹²⁵I-IgG-15C8 in the TR-718 cells were subtracted from the values observed in the cells transfected with the LDL receptor cDNAs. These control values are given in the legend to Fig. 10. In this experiment cells transfected with pR1 bound the same amount of ¹²⁵I-IgG-15C8 at the cell surface as did the cells expressing the normal cDNA (Fig. 10A). However, the amount of internalized ¹²⁵I-IgG-15C8 in the pR1 cells was only half the amount in the pLDLR-2 cells (Fig. 10B). The amount of degradation was even more severely reduced (Fig. 10C). The calculated internalization indexes at both concentrations of ¹²⁵I-IgG-15C8 were similar to those in the experiment of Fig. 9 (i.e. 21 for the pLDLR-2 cells and 3.0 for the cells expressing pR1).

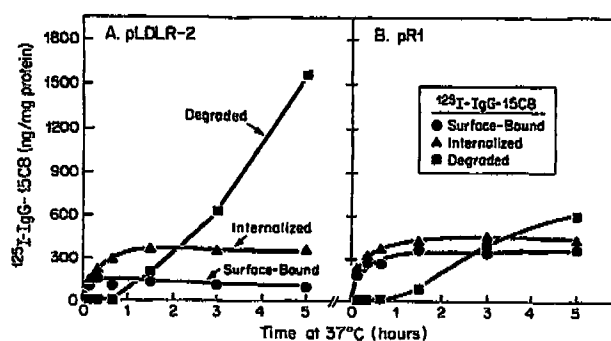


FIG. 9. Time course of metabolism of ¹²⁵I-IgG-15C8 at 37 °C in cells transfected with pR1. On day 4 of cell growth, cells transfected with the indicated cDNA received 2 ml of warm Eagle's minimum medium supplemented with 5% human lipoprotein-deficient serum and 30 μg/ml either ¹²⁵I-IgG-15C8 (205 cpm/ng) or ¹²⁵I-IgG-2001 (206 cpm/ng). After incubation for the indicated time at 37 °C, the total amounts of surface-bound (●), internalized (▲), and degraded (■) ¹²⁵I-ligand were determined. The values shown represent specific values for ¹²⁵I-IgG-15C8, which were determined by subtracting the values for ¹²⁵I-IgG-2001 (monoclonal antibody against irrelevant antigen) from those for ¹²⁵I-IgG-15C8 (monoclonal antibody against LDL receptor). Each value represents the average of duplicate incubations.

DISCUSSION

The current experiments localize the binding sites for monoclonal antibodies IgG-C7 and IgG-15C8 to the first of the seven cysteine-rich repeats in the ligand-binding domain of the LDL receptor. When this repeat was deleted through oligonucleotide-directed mutagenesis, the receptor could no longer bind either of the two monoclonal antibodies. Somewhat surprisingly, this deleted receptor continued to bind LDL and β-VLDL, the two major ligands for the LDL receptor, with normal affinity. A severely truncated receptor in which the first cysteine-rich repeat was essentially the only external domain bound the two monoclonal antibodies, but it did not bind lipoproteins. These data establish that the first cysteine-rich repeat is both necessary and sufficient for binding of the two monoclonal antibodies.

The seven repeats in the LDL receptor show conservation in the spacing of the cysteine residues and in certain amino acid positions. The sequence Asp-Cys-X-Asp-Gly-Ser-Asp-Glu near the COOH terminus of each repeat is especially well conserved. None of the seven repeats has more than a single substitution in this sequence (1, 27). This negatively charged sequence has been postulated to be involved in the binding of apoB-100 and apoE (1), which are known to contain positively

state, they make the performance of pulse-chase experiments difficult. We have therefore been unable to do warmup experiments to determine whether receptor-bound ^{125}I -IgG-15C8 transiently enters cells transfected with pR1. In the future we plan to use electron microscope histochemistry to clarify this issue.

The current data establish that the first repeat of the LDL receptor is not necessary for binding or uptake of lipoproteins in cultured fibroblasts, and this raises the question of the function of this repeat and the reason for its conservation during evolution. Clearly, the function of this repeat is not to bind monoclonal antibodies! It is likely that this repeat may play some role in LDL receptor function in some tissue other than fibroblasts. Alternatively, it may be an accident of evolution that is maintained because it has subtle beneficial effects on the protein structure.

Acknowledgements—We thank Y. K. Ho and Jacky Dailey for assistance in production of monoclonal antibodies; Wen-Ling Niu, Deborah Noble-Schlessinger, and Gloria Brunschede for excellent technical assistance; Edith Womack for able assistance with the tissue culture work; and Shirley Hall for able assistance with the gel electrophoresis.

REFERENCES

- Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G. W., Russell, D. W., and Schneider, W. J. (1985) *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 1-39
- Lehrman, M. A., Schneider, W. J., Südhof, T. C., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Russell, D. W. (1985) *Science* **227**, 140-146
- Hobbs, H. H., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Russell, D. W. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 13114-13120
- Lehrman, M. A., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Russell, D. W., and Schneider, W. J. (1985) *Cell* **41**, 735-743
- Davis, C. G., Elhammer, A., Russell, D. W., Schneider, W. J., Kornfeld, S., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2828-2838
- Davis, C. G., Goldstein, J. L., Südhof, T. C., Anderson, R. G. W., Russell, D. W., and Brown, M. S. (1987) *Nature* **326**, 760-765
- Haefliger, J.-A., Tschopp, J., Nardelli, D., Wahli, W., Kocher, H.-P., Tosi, M., and Stanley, K. K. (1987) *Biochemistry* **26**, 3551-3556
- Howard, O. M. Z., Rao, A. G., and Sodetz, J. M. (1987) *Biochemistry* **26**, 3565-3570
- Doolittle, R. F. (1985) *Trends Biochem. Sci.* **10**, 233-237
- Lehrman, M. A., Russell, D. W., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 3354-3361
- van Driel, I. R., Davis, C. G., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 16127-16134
- Davis, C. G., Lehrman, M. A., Russell, D. W., Anderson, R. G. W., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986) *Cell* **45**, 15-24
- Davis, C. G., van Driel, I. R., Russell, D. W., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 4075-4082
- Beisiegel, U., Schneider, W. J., Goldstein, J. L., Anderson, R. G. W., and Brown, M. S. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 11923-11931
- Russell, D. W., Schneider, W. J., Yamamoto, T., Luskey, K. L., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1984) *Cell* **37**, 577-585
- Goldstein, J. L., Basu, S. K., and Brown, M. S. (1983) *Methods Enzymol.* **98**, 241-260
- Kita, T., Brown, M. S., Watanabe, Y., and Goldstein, J. L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 2268-2272
- Kingaley, D. M., and Krieger, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 5454-5458
- Beisiegel, U., Schneider, W. J., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 13150-13156
- McKearn, T. J. (1980) in *Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses* (Kennett, R. H., McKearn, T. J., and Bechtol, K. B., eds) pp. 368-369, Plenum Press, New York
- Yamamoto, T., Davis, C. G., Brown, M. S., Schneider, W. J., Casey, M. L., Goldstein, J. L., and Russell, D. W. (1984) *Cell* **39**, 27-38
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, pp. 1-545, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Südhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Russell, D. W. (1985) *Science* **228**, 815-822
- Zoller, M. J., and Smith, M. (1984) *DNA (NY)* **3**, 479-488
- Stein, O., Weinstein, D. B., Stein, Y., and Steinberg, D. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 14-18
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
- Yamamoto, T., Bishop, R. W., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Russell, D. W. (1986) *Science* **232**, 1230-1237
- Innerarity, T. L., Weisgraber, K. H., Arnold, K. S., Rall, S. C., Jr., and Mahley, R. W. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 7261-7267
- Basu, S. K., Goldstein, J. L., Anderson, R. G. W., and Brown, M. S. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 3178-3182
- Daniel, T. O., Schneider, W. J., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 4606-4611
- Müller-Eberhard, H. J. (1986) *Annu. Rev. Immunol.* **4**, 503-528

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 92,039
FECHA : NOVIEMBRE 13 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 02-079394- -00011-0000

Fecha: 2007-11-19 16:47:26 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act 444 RESPUESTAREQUE Folios: 20

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	40025376	13/11/2007	73,481,466.00

CONCEPTO

CANT. REGISTRADO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 0000-01-03 CAMBIO DE MARCA Y MODIFICA	12 MARCAS Y LENAS COMERCIALES	77,000.00
	TOTAL :	\$ 77,000.00

NOVENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

090. 13414-841-001-9

1 294

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**

Radicación No. 02-79394

Clasificación Internacional (IPC): A61K 38/20

Concepto Técnico No. 2500

Como resultado del examen definitivo, realizado con fundamento en el artículo 48 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

- 1.1. Descripción: Folios: 51 a 115 como se radicó inicialmente
- 1.2. Reivindicaciones: 1 a 9, folios 283 y 284.
- 1.3. Prioridad: Si se tiene en cuenta, ver folio 1 del expediente

2. Objeto de la invención

- Título de la solicitud: Anticuerpos monoclonales al receptor LDL humano, su producción y uso.

La presente solicitud se refiere a un anticuerpo monoclonal, específicamente reconoce y se liga al receptor LDL humano, más específicamente a LDLR +291, que no se trata de el anticuerpo monoclonal C7. Dicho anticuerpo puede ser producido por los hibridomas depositados bajo los números CNMC I-2390, CNMC I-1291, CNMC I-2392, CNMC I-2393. Los anteriores anticuerpos pueden ser usados para la detección y cuantificación de LDLR humano en métodos como ELISA, Western blot. Adicionalmente dichos anticuerpos son capaces inhibir la replicación del virus de la hepatitis C al poner en contacto las células con el anterior mAb antes de la infección. También hace parte de la invención, el método para preparar anticuerpo monoclonal que comprende generar un hibridoma clonado que comprende una célula de vaso de mamífero inmunizado con hsLDLR +291 y una célula linfoide en medio líquido o en abdomen de mamífero, para permitir que se produzca y se acumule el anticuerpo monoclonal.

El objeto de la solicitud definido anteriormente se clasificó en la IPC C07K 16/28, C12N 5/20, G01N 33/577.

3. De la solicitud de Patente (según el caso)

3.1. Descripción (artículo 28 D. 486)

En la solicitud no existe sustento experimental que permita establecer que todos los anticuerpos obtenidos a partir de los hibridomas reivindicados presentan un efecto técnico sorprendente. Solo se efectuaron ensayos que podrían dar indicios de la capacidad de inhibir la replicación de Hep CV, para 3 anticuerpos Mab 12.6, Mab 28, Mab 29.8.

4. Unidad de invención (artículo 25 D 486)

En los conceptos técnicos anteriores se indicó claramente que para que diferentes moléculas (anticuerpos) puedan ser considerados como un mismo objeto, deben: i) presentar una estructura común (nueva e inventiva) así como una ii) función o actividad común demostrada.

El solicitante argumenta en la respuesta presentada el 19 de noviembre de 2007 que los anticuerpos reclamados sí presentan una relación estructural porque todos presentan el mismo isotipo de inmunoglobulina, que es IgG1. Sin embargo, este isotipo no es nuevo, no es inventivo, de hecho es producto del sistema inmune del mamífero estimulado, no constituye una creación de la actividad inventiva del señor solicitante y por lo tanto no puede ser considerada como concepto común nuevo e inventivo que vincule todos los anticuerpos anti LDLR reivindicados. De hecho los anticuerpos anti LDR de las anterioridades también pueden presentar ese mismo isotipo.

Por otra parte también establece en su memorial: i) todos los anticuerpos se obtuvieron utilizando el antígeno del receptor LDL humano soluble, ii) todos especifican (entendido como son específicos para) el LDLR soluble humano y iii) todos son capaces de inhibir la replicación del virus de la hepatitis C.

Este Despacho se mantiene en que al no efectuar la caracterización estructural de los anticuerpos (mediante las secuencias novedosas e inventivas no existentes en el estado de la técnica) no se puede establecer si constituyen un mismo objeto o no. Como ya se mencionó la definición de la molécula que reconocen NO puede constituir el concepto común inventivo, porque moléculas diferentes estructuralmente se pueden unir a un mismo target. De igual manera el método de producción de los anticuerpos monoclonales tampoco puede representar el concepto vinculante nuevo e inventivo dado que la técnica del hibridoma ya había sido empleada para la obtención de anticuerpos anti-LDLR.

Por último es imperativo observar que la divulgación de la descripción contradice el postulado del solicitante que "todos son capaces de inhibir la replicación del virus de la hepatitis C", pues si se observa la figura 3 se encuentra que se evaluaron únicamente 3 anticuerpos: Mab 12.6, Mab 28, Mab 29.8, en donde el Mab 28 NO inhibe la replicación de HCV. Es decir, además de no evaluar todos los anticuerpos reivindicados (solo 3 de los 5), 1 de los evaluados no cumple con el efecto técnico deseado.

Así pues que los 5 hibridomas reclamados no presentan estructura común novedosa e inventiva, ni la misma actividad y en ese orden de ideas las reivindicaciones 1 a 6 no cumplen con el requisito de Unidad de Invención, como tampoco pueden llegar a demostrar altura inventiva.

5. Determinación del Estado de la Técnica

Considerando que la fecha de presentación de la primera solicitud de patente de la cual se reivindica prioridad es: 13 de marzo de 2000, se

buscaron documentos del estado de la técnica relacionados, con fecha de publicación anterior a esta.

Se hizo la búsqueda de documentos relevantes en el estado de la técnica, entendiendo como estado de la técnica la definición provista en el artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina y las excepciones fijadas en el artículo 17 de la misma.

Se encontró como anterioridades (documentos cuya fecha de publicación es anterior a la fecha de presentación de la primera solicitud de patente sobre la cual se reivindica prioridad o de la fecha de presentación de esta solicitud) que pueden afectar la patentabilidad del objeto de la presente solicitud.

6.

Nº	Documento	Título	Fecha de Publicación
1	Van Driel et al. The journal of Biological Chemistry vol 264, No 16,	Stoichiometric binding of low density lipoprotein (LDL) and monoclonal antibodies to LDL receptors in a solid phase assay"	5 junio de 1989
2	V. Agnello et al. Proceedings of the National Academy of sciences of the USA	Hepatitis C virus and other flaviridae virus enter cells via low density lipoprotein receptor	1999-10-26
3	Van Driel et al, The journal of biological chemistry Vol 262 No 33, 16127-13134	Self association of the low density lipoprotein receptor mediated by the cytoplasmic domain	1987

*Si se trata de una solicitud colombiana esta fecha corresponde también a la fecha de presentación de la solicitud colombiana aún sin haber sido publicada o sin habersele cumplido el plazo previsto en el art.40.

7. Análisis de patentabilidad (según requisito) (artículo 14 D486)

7.1. Nivel inventivo (artículo 18 D486)

El Nivel Inventivo se evaluó por comparación entre lo solicitado y encontrado en el estado de la técnica y que se relaciona con el objeto reivindicado y de acuerdo con la definición de nivel inventivo del Artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Las reivindicaciones 1 a 6 reclaman anticuerpos monoclonales contra el receptor de LDL, que son obtenidos por la técnica del hibridoma empleando péptidos sintéticos que comprenden residuos presentes en el receptor LDL soluble humano y que presentan actividad antiviral. Se indican los 5 hibridomas depositados ante la ATCC. Las reivindicaciones 7 a 9 reclaman métodos para la producción de los anteriores anticuerpos monoclonales, para la purificación de LDL-R soluble y para inhibir la replicación del virus de la hepatitis C.

El documento D1 revela varios anticuerpos monoclonales contra LDL-R humano (HL1, C7, 15C8, 4A4) que se usan en fase sólida para la detección de LDL-R y que son preparados por la técnica del hibridoma. Los

anteriores anticuerpos presentan como propiedad intrínseca un efecto antiviral.

El documento D2 revela un anticuerpo anti LDL-R denominado C7 que exhibe un efecto antiviral (contra hepatitis C y flaviviridae) dada su unión al receptor LDL.

El documento D3 divulga el descubrimiento de ciertas propiedades del receptor LDL, en el cual se efectuaron diferentes mutaciones con el objeto de establecer los mecanismos de internalización de dicho receptor. En el mismo estudio se empleó un anticuerpo IgG-HL1. El anterior anticuerpo fue producido usando un péptido sintético que se une a los residuos 163 a 174 del receptor humano de LDL, presente en la porción soluble de dicho receptor, (de la misma forma que se obtuvieron los anticuerpos de la presente solicitud)

La respuesta al problema técnico que se pretende resolver es entonces proporcionar anticuerpos monoclonales alternativos anti LDL-R y su uso en la inhibición de la replicación de HCV.

Los anticuerpos anti LDL-R son bien conocidos en el estado del arte especialmente a partir de las anterioridades D1 a D3, así como la técnica del hibridoma que es de uso convencional para la preparación de anticuerpos monoclonales, conocida por décadas por los técnicos de la materia.

Adicionalmente, y teniendo en cuenta que tras la lectura de todo el capítulo descriptivo no se encuentra evidencia experimental que los anticuerpos de la presente invención exhiban un efecto sorprendente o inesperado respecto de los ya conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo sobre C7, resulta que la materia reclamada en las cláusulas 1 a 9 se deriva evidentemente del estado del arte y no cumple con el requisito de Nivel Inventivo.

El solicitante indica en su respuesta al último concepto técnico, que los anticuerpos de la solicitud se obtienen utilizando un antígeno del receptor LDL humano soluble altamente purificado (epitopes tridimensionales), , que representan una "nueva calidad" para los antígenos utilizados en la producción de anticuerpos anti LDLR que da como resultado anticuerpos específicos para LDLR soluble humano, mientras que los anticuerpos similares del estado de la técnica se produjeron utilizando LDLR parcialmente purificado o péptidos sintéticamente cortos.

A lo anterior, este Despacho manifiesta que es imposible afirmar que los anticuerpos de la anterioridad eran menos específicos para el LDLRsoluble humano que los reivindicados en la presente solicitud, pues el solicitante aun conociendo el estado de la técnica no efectuó comparaciones entre los mAbs de la presente solicitud y los previamente divulgados. Así que, el anterior argumento sin un sustento experimental constituye una mera suposición.

Adicionalmente, el solicitante menciona que una persona versada en la materia no tenía motivación alguna a ensayar el "LDLR+291" soluble humano, (es decir la forma del receptor soluble humano que incluye las secuencia ASP+4 a Glu +291 de la secuencia soluble de LDLR) para generar anticuerpos monoclonales, cuando la enseñanza en el arte es que

estructura que el solicitante indica como común es la presente en un sinnúmero de anticuerpos y es una estructura que además existe de manera espontanea en la naturaleza e inventiva, ni la misma actividad. Además no todos los anticuerpos exhiben la misma actividad, tal como se muestra en la figura 3. El método de obtención de mAbs que consiste en identificar un epítope adecuado y generar anticuerpos contra dicho antígeno mediante la técnica del hibridoma es conocida por cualquier técnico en la materia desde hace décadas y por lo tanto no puede ser considerada como el concepto novedoso que vincula todos los anticuerpos.

9.2 Los anticuerpos de la solicitud si exhiben altura inventiva porque se obtienen utilizando un antígeno del receptor LDL humano soluble altamente purificado (epítopes tridimensionales), que representa una “nueva calidad” para los antígenos utilizados en la producción de anticuerpos anti LDLR dando como resultado anticuerpos específicos para LDLR soluble humano. Adicionalmente no existía motivación a ensayar el “LDLR+291” soluble humano,(es decir la forma del receptor soluble humano que incluye las secuencia ASP+4 a Glu +291 de la secuencia soluble de LDLR) para generar loa anticuerpos mencionados.

Tal como se mencionó anteriormente, la identificación de un epítope apropiado para la generación de anticuerpos no es suficiente para atribuirle el nivel inventivo al anticuerpo generado, si dicho anticuerpo en sí mismo no representa un salto cualitativo en la formulación de la regla técnica. Como ya se mencionó en el aparte de unidad de Invención en la presente solicitud no existe evidencia experimental que soporte el postulado que los anticuerpos de la presente invención representan un verdadero aporte al estado de la técnica.

En consecuencia y por todo lo expuesto anteriormente, se recomienda **Negar** las reivindicaciones: 1 a 9 (folios:283 a 284).

Bogotá, D.C., 7 diciembre de 2007

CONCEPTO TECNICO No. 2500	EXAMINADOR TECNICO Código No.202063
-------------------------------------	---