

**No. 12-155949- -00006-0000**Fecha: 2014-07-28 16:54:51
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 523 RESPUESTADep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 25Carlos R. Olarte
Juan G. MouréAlexander Agudelo
Carlos A. Parra
Juan F. Acosta
Andrés Rincon
Mónica Guevara
Andrés Alvarado
María C. Calderín
Mauricio Avila
José J. Dangond
Gina Cáceres
Isabella Herrera
Zaava Ravid
Alejandro Mouré
Miguel F. Porras
Catalina Amaya
Laura M. Escobar
Lorena Andrade
Sergio Arboleda
Carolina Ceis
Catalina Jiménez
Daniela González
David A. Ramírez
Ivonne M. SierraMedellín
María C. Múnera
Édhe Mantos
Adrián SantamaríaBarranquilla
Gina De Echena

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: Expediente No. 12-155.949

Solicitud de patente de invención titulada: "ANTICUERPOS CON UNIÓN
DE ANTÍGENOS DEPENDIENTE DEL PH"

Solicitante: RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION y PFIZER INC.

Nuestra Ref.: P2012/000110

RESPUESTA AL OFICIO No. 3424, NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA No. 011**DE FECHA 18 DE MARZO DE 2014****(PRIMER EXAMEN DE FONDO)**

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal previsto en el artículo 45 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

1. En primer lugar, con el ánimo de brindar mayor claridad a la presente solicitud, me permito adjuntar un **Capítulo Reivindicatorio Modificado**, que reemplaza en su totalidad al Capítulo Reivindicatorio presentado originalmente.

Así las cosas, el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto contiene los siguientes cambios:

- se eliminaron las antiguas Reivindicaciones 1 a 19 y 31;
- se eliminó la expresión "o una variante de las mismas que tiene una, dos, tres o más sustituciones conservadores de aminoácidos en CDR1, CDR2, y/o CDR3" de las Reivindicaciones 1 a 4 (antiguas Reivindicaciones 20 a 23);
- las demás reivindicaciones, así como sus relaciones de dependencia, se reenumeran de acuerdo con los cambios realizados.

Valga anotar que las modificaciones efectuadas al Capítulo Reivindicatorio cumplen a cabalidad con lo estipulado en el Artículo 34 de la Decisión 486, ya que éstas de ninguna manera implican una ampliación de la protección correspondiente a la divulgación contenida en la solicitud inicial. Por el contrario, éstas corresponden a una limitación de la materia reivindicada.

2. a- La Examinadora señala que las Reivindicaciones 16 y 31 reclaman materia no patentable de acuerdo con el artículo 20, literal d, de la Decisión 486.

b- Considero superada la anterior objeción, en tanto que dichas Reivindicaciones fueron completamente eliminadas del Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, tal y como se señaló en el punto 1 del presente memorial.

3. a- La Examinadora señala que el Capítulo Reivindicatorio no es claro ni conciso por las siguientes razones:

- las Reivindicaciones 1 a 15 reclaman resultados a alcanzar sin definir completamente el anticuerpo de forma estructural;
- las Reivindicaciones 3 y 4 están redactadas de tal forma que constituyen un disclaimer;
- las Reivindicaciones 10 a 13 y 15 contienen la expresión “aproximadamente”, lo que no permite determinar con exactitud del estado de la técnica, ni permite determinar el alcance de la invención;
- las Reivindicaciones 17 y 19 reclaman un procedimiento pero no está definido por características como etapas o condiciones específicas;
- las Reivindicaciones 20 a 25 reclaman un anticuerpo que no está definido por sus características estructurales;
- la Reivindicación 28 reclama una célula huésped que no está definida como una línea celular y no se indica su número de depósito;
- la Reivindicación 29 comprende un ácido nucleico que no está caracterizado en términos de la secuencia de nucleótidos y tampoco referencia a la secuencia del anticuerpo completo;
- el Capítulo Reivindicatorio es excesivamente complejo, por lo que dificulta determinar el alcance de lo que se busca proteger.

b- i) En primer lugar, respetuosamente considero superadas todas las objeciones de claridad y concisión relacionadas con las Reivindicaciones 1 a 19 y 31, ya que éstas fueron eliminadas completamente del Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, tal y como señalé en el numeral 1 del presente memorial.

ii) En cuanto a las nuevas Reivindicaciones 1 a 6 (antiguas Reivindicaciones 20 a 25), difiero diametralmente de la opinión de la Examinadora, en tanto éstas son perfectamente claras para la persona medianamente versada en la materia. Dichas reivindicaciones reclaman claramente un anticuerpo aislado que se une específicamente a PCSK9 y está definida en términos estructurales tanto por las regiones variables de cadena pesada y las regiones determinantes de complementariedad, de acuerdo a las SEQ ID NO: 3 a 12, que encuentran soporte en la sección de Listado de Secuencias.

iii) En cuanto a las objeciones respecto a las nuevas Reivindicaciones 9 y 10 (antiguas Reivindicaciones 28 y 29), me permito recordarle al Examinador respetuosamente que un inventor está en su derecho de reclamar protección para la totalidad de un concepto inventivo desarrollado, sin importar la amplitud de éste, siempre y cuando se conserve el principio de unidad de invención y no haya arte previo que afecte su patentabilidad. Es decir, una reivindicación puede ser tan amplia como se requiera o puede contener la información que el inventor considere necesaria, para así poder enmarcar la totalidad del concepto inventivo desarrollado sin que las reivindicaciones puedan considerarse repetitivas o redundantes.

Particularmente, respecto a la nueva Reivindicación 9 (antigua Reivindicación 28), me permito aclararle a la Examinadora que ésta no requiere información respecto a la línea celular ni tampoco el número de depósito, pues ésta reclama célula huésped en general, cuya característica esencial es la producción recombinantemente del anticuerpo de cualquiera de las nuevas Reivindicaciones 1 a 6, que definen los anticuerpos de la invención estructuralmente por medio de sus secuencias particulares. En consecuencia, la Reivindicación 9 es clara.

Asimismo, la nueva Reivindicación 10 (antigua Reivindicación 29) es dependiente de las Reivindicaciones 1 a 6. En este sentido, la persona medianamente versada en la materia entiende perfectamente que existen ciertos codones que codifican para cada uno de los diferentes aminoácidos que componen las secuencias que conforman el anticuerpo reclamado en la Reivindicación 1, por lo que no encontraría ningún problema en entender dicho ácido nucleico en términos de su estructura, por lo que considero superada dicha objeción.

En este orden de ideas, las actuales Reivindicaciones 9 y 10 son lo suficientemente claras y específicas para determinar los anticuerpos que se descan proteger y permitir a cualquier persona medianamente versada en la materia determinar con absoluta claridad y sin ambigüedades el alcance de la protección de la presente invención, así como cualquier célula que de forma recombinante los produzca a partir de una secuencia de ácido nucleico específica que codifique para ellos.

iv) Finalmente, considero respetuosamente que el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto cumple con los requisitos de claridad y concisión establecidos en la Decisión 486, y a la luz del Manual Andino de Patentes (MAP) y la Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad de la SIC, permitiéndole a la persona medianamente versada en la materia comprender inequívocamente el alcance de la materia reclamada.

4. a- La Examinadora señala que la patente WO2009/125828 (D1) afecta la novedad de las Reivindicaciones 1 a 15 y 17 a 19.

b- Considero superadas las objeciones de novedad ya que, como se mencionó en el numeral 1 del presente memorial, dichas reivindicaciones fueron eliminadas completamente del Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto.

5. a- La Examinadora señala que el artículo “A Proprotein Convertase Subtilisin-like/Kexin Type 9 (PCSK9) C-terminal Domain Antibody Antigen-binding Fragment Inhibits PCSK9 Internalization and Restores Low Density Lipoprotein Uptake”¹ (D2) afecta el nivel inventivo de las Reivindicaciones 20 a 30.

La Examinadora señala que D2 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención porque divulga anticuerpos anti-PCSK9, en donde dichos anticuerpos no bloquean la unión a la LDLR de PCSK9, pero inhiben la absorción de LDL dependiente de PCSK9 en células HEK293 y HepG2, así como la internalización de los PCSK9 en células HEK293. Adicionalmente, la Examinadora argumenta que los anticuerpos allí divulgados presentan una afinidad a la subunidad gamma de PCSK9 y que éste se une dentro del dominio C-terminal de PCSK9.

Con base en lo anterior, la Examinadora considera que la diferencia entre los anticuerpos del arte previo y los de la presente invención radica en las secuencias de los CDRs de cadena pesada y ligera, pero no otorgan un efecto técnico mejorado. Consecuentemente, y teniendo en cuenta que el problema técnico objetivo es la obtención de inhibidores de PCSK9 que incrementen la semivida del antígeno, la persona medianamente versada en la materia generaría variaciones múltiples de anti-PCSK9 empleando técnicas convencionales y métodos de biología molecular, para así llegar al objeto de las Reivindicaciones 20 y 21, por lo que se considera obvia.

¹ Y. G. Ni et al., “A Proprotein Convertase Subtilisin-like/Kexin Type 9 (PCSK9) C-Terminal Domain Antibody Antigen-Binding Fragment Inhibits PCSK9 Internalization and Restores Low Density Lipoprotein Uptake,” *Journal of Biological Chemistry* 285, no. 17 (April 23, 2010): 12882–91, doi:10.1074/jbc.M110.113035.

b- i) En primer lugar, en la tabla comparativa que se presenta en el folio 4 del Examen de Fondo, extrañamente se hace referencia al documento D1, sin embargo el desarrollo de los argumentos del examen de fondo están únicamente relacionado con D2. Así las cosas, considero que la Examinadora en realidad hace referencia a D2 y la mención de D1 en la tabla fue un error tipográfico, pues de existir objeciones relacionadas con D2, éstas deberían ser explícitas y encontrarse debidamente motivadas.

ii) Ahora bien, me permito señalar que la presente invención reclama un anticuerpo aislado que se une específicamente a PCSK9 y está definida en términos estructurales tanto por las regiones variables de cadena pesada y las regiones determinantes de complementariedad, de acuerdo a las SEQ ID NOS: 3 a 12, así como el plásmido que lo codifica, composiciones de éste, una célula huésped que lo produce de forma recombinante y un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo.

iii) Así, teniendo en cuenta el arte previo citado por la Examinadora, me permito realizar el análisis de nivel inventivo, de acuerdo con la Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad de la SIC² en donde se señala que *“Durante el examen de nivel inventivo debe hacerse un juicio de valor y un análisis objetivo de las divulgaciones previas del estado de la técnica, no influenciados por el conocimiento que ya se tiene de la Invención que se está evaluando. Por tanto, con el fin de minimizar la subjetividad y evitar que se realice un análisis en retrospectiva (“hindsight” ó “a posteriori”), el examen debe relacionar la invención con la solución de un problema técnico, mediante el Método “problema-solución”.”* (subrayado fuera de texto)

A. Identificar el estado de la técnica cercano a la invención reivindicada.

D2 efectivamente puede ser considerado como el estado de la técnica cercano, en tanto que está dirigido al estudio de la actividad inhibidora del anticuerpo 1G08 sobre la proteína PCSK9 con y sin la región C-terminal, lo que mostró que dicha región de la proteína es una parte clave para la inhibición al utilizarse 1G08.

B. Determinar la diferencia entre la invención y el estado de la técnica más cercano.

² Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad de la SIC , 2014, sección 2.13.5, páginas 131-134 (disponible en http://api.sic.gov.co/Documentos/Guia_Examen_Patentes.pdf)

De acuerdo con los lineamientos establecidos por la SIC, me permito presentar el siguiente cuadro comparativo entre las características esenciales de la presente invención y las enseñanzas del documento del arte previo citado:

Características esenciales	D2
No menciona	Un estudio en el que se demostró que el dominio C-terminal de PCSK9 contribuyen a la inhibición de la función LDLR principalmente a través de su papel en la captación celular de PCSK9 y complejo LDLR (abstract).
Un anticuerpo aislado	Anticuerpo 1G08Fab (abstract)
Que se une específicamente a PCSK9	Con afinidad sub-nanomolar por PCSK9 (abstract)
que comprende una región variable de cadena pesada (VH) una región determinante de la complementariedad (CDR1), una CDR2 de VH y una CDR3 de VH de la secuencia de aminoácidos de VH mostrada en SEC ID NO: 4 ó 5	No menciona

Con base en la tabla anterior, comparando las características esenciales de la presente invención junto con el arte previo citado por la Examinadora, me permito señalar respetuosamente que el análisis superficial de la Examinadora es errado.

Antetodo, D2 está dirigido al estudio de la actividad inhibidora del anticuerpo 1G08 sobre la proteína PCSK9 con y sin la región C-terminal, lo que mostró que dicha región de la proteína es pieza clave para la inhibición al utilizarse 1G08. Adicionalmente, D2 no presenta sección de información de soporte en donde se muestren las secuencias de aminoácidos que forman el anticuerpo 1G08, por lo que no es posible determinar si los anticuerpos aquí reclamados son estructuralmente similares a los divulgados en D2.

Asimismo, el anticuerpo 1G08 de D2 no posee el mismo sitio de unión que el reclamado por la presente invención. El anticuerpo 1G08 se une por medio del C-terminal de la proteína PCSK9, mientras que los anticuerpos de la presente invención se unen vía el sitio de unión LDLR. Por el contrario, y totalmente alejado del arte previo citado por la Examinadora, el sitio de unión de la presente invención es comparable con el sitio de unión de unión del anticuerpo J16 divulgado en el artículo del Dr. Liang, “Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Antagonism Reduces Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Statin-Treated Hypercholesterolemic Nonhuman Primates”³ (Anexo 1), en la página 231, figura 2, donde se ve claramente que el sitio de unión de la presente invención se encuentra señalado en rojo.

Por su parte, es importante señalar que la presente invención no trata ni está relacionada con la elucidación de un mecanismo de absorción, sino que se refiere a anticuerpos con unión

³ H. Liang et al., “Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Antagonism Reduces Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Statin-Treated Hypercholesterolemic Nonhuman Primates,” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 340, no. 2 (February 1, 2012): 228–36, doi:10.1124/jpet.111.187419.

dependiente de pH a su antígeno, o de tal forma que la afinidad de unión al antígeno a pH fisiológico (es decir, pH 7,4) es mayor que a pH endosómico (es decir, pH 6,0 o 5,5). En otras palabras, la proporción de K_D o la proporción de k_{off} a pH 5,5/pH 7,4 o a pH 6,0/pH 7,4 es más de, o varía entre, 2, 3, 4, 8, 10, 16, 20, 30, 40, o 100 o más. Además, los anticuerpos reclamados, al ser dependientes de pH, se disocian preferencialmente del antígeno en el endosoma, lo que puede incrementar la semivida del anticuerpo, en comparación con los anticuerpos con K_D equivalentes a pH 7,4 pero con ninguna unión dependiente de pH, cuando el antígeno es uno que sufre la eliminación mediada por antígeno (por ejemplo, PCSK9). Los anticuerpos con unión dependiente de pH de la presente invención también pueden disminuir la semivida de antígeno total cuando el antígeno sufre eliminación reducida al unirse a un anticuerpo (por ejemplo, IL6), así como prolongar el decrecimiento en antígeno que no está unido a anticuerpo. Esto puede ser importante cuando se antagoniza un antígeno objetivo típicamente presente a niveles altos (por ejemplo, IgF, DKK1, C5 y SOST). Además, tales anticuerpos pueden incrementar la semivida de antígeno cuando el antígeno es un receptor que tiene eliminación incrementada cuando se une a anticuerpo (por ejemplo, receptor de GMCSF).

En este orden de ideas, y teniendo en cuenta que se trata de dos enfoques completamente distintos respecto a anticuerpos con afinidad hacia la proteína PCSK9, **D2 no enseña ni las características estructurales de la presente invención, ni siquiera las del 1G08 allí mencionado** y menos aún las propiedades funcionales alcanzadas.

C. Definir el efecto técnico causado y atribuible al elemento diferencial.

Dadas las diferencias entre la presente invención y el arte previo expuestas en el presente memorial, el efecto técnico alcanzado en el presente caso consiste en todos y cada uno de los resultados demostrados en las Tablas 5, 7 y la Figura 8 (A y B) de la presente invención, que al parecer, la Examinadora ha ignorado por completo.

Así entonces, me permito llamar la atención de la Examinadora sobre los **efectos sorprendentes** de la presente invención, iniciando con los resultados para la afinidad de PCSK9 humano que se muestran en la Tabla 5, y los resultados para la afinidad de PCSK9 de ratón que se muestran en la Tabla 6. Estos datos revelan que los anticuerpos se pueden diseñar y seleccionar para tener afinidad más alta por PCSK9 humano o de ratón a pH 7,4, y una afinidad inferior a pH 5,5. Me permito aclarar además que el anticuerpo 5L1721H_236L3H3 es el anticuerpo cuyas cadenas variables pesadas y ligeras son aquellas constituidas por las SEQ ID NOs: 5 y 3, respectivamente, el cual muestra una relación de $K_{D(pH = 5,5)}/K_{D(pH = 7,4)}$ igual a 14,4 para anti-

PCSK9 humano y 14,4 para PCSK9 de ratón, esto es, un anticuerpo con mucha mayor afinidad sobre PCSK9 a pH fisiológico que a pH endosómico, como lo resalto a continuación:

Tabla 5. Afinidades de unión para los anticuerpos anti-PCSK9 que se unen a PCSK9 humano a pH 7,4 y 5,5.

	huPCS K9 pH 7,4				huPCS K9 pH 5,5				pH 5,5/7,4	
	kon (1/Ms)	Koff (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	kon (1/Ms)	Koff (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM))	KD	
6L1721	3,29E+04	7,08E-05	880	2,2	1,66E+05	8,40E-04	1059	5,1	2,3	
5A10.B8	4,38E+04	1,04E-04	1080	2,4	1,31E+05	3,91E-04	1020	3,0	1,3	
5L1721H23 6L3H3	<u>4,42E+04</u>	<u>1,72E-04</u>	<u>934</u>	<u>3,9</u>	<u>8,28E+04</u>	<u>4,80E-03</u>	<u>1430</u>	<u>58</u>	<u>14,9</u>	
6L1721H23	5,02E+04	2,01E-04	645	4,0	1,10E+05	2,61E-03	1140	24	6	
5L1721H23 6L3	3,09E+04	2,14E-04	974	6,9	6,45E+04	0,0166	1320	257	37,2	
5L1721H23 6H3	3,74E+04	2,73E-04	461	7,3	1,41E+05	7,72E-03	398	55	7,5	
5L1721H23	3,17E+04	3,99E-04	990	13	1,24E+05	0,0179	1030	144	11,1	
5L1724H23 6L3H3	2,23E+04	3,42E-04	1020	15	9,55E+04	7,89E-03	1500	83	5,5	
5L1724H23 6L3	3,59E+04	7,90E-04	910	22	7,54E+04	0,0407	1050	540	24,5	
6L21H2335	5,81E+04	7,33E-03	892	126	6,55E+05	2,38E-01	624	363	2,9	
5L1724H23	-	-	20	-	2,03E+05	7,93E-03	114	39		
5L1724H35	-	-	40	-	-	-	0	-		

Tabla 6. Afinidades de unión para los anticuerpos anti-PCSK9 que se unen a PCSK9 de ratón a pH 7,4 y 5,5.

	msPCK9 pH 7,4				msPCK9 pH 5,5				huPCK9 pH 5,5/7,4
	kon (1/Ms)	Koff (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	kon (1/Ms)	Koff (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	KD
6L1721	8,80E+04	2,28E-04	1260	2,6	3,38E+05	1,77E-03	1120	5,2	2,0
5A10 WT	1,01E+05	4,85E-04	1410	4,8	3,73E+05	1,94E-03	1050	5,2	1,1
5L1721H23 6L3H3	<u>6,37E+04</u>	<u>5,16E-04</u>	<u>1630</u>	<u>8,1</u>	<u>1,60E+05</u>	<u>0,0187</u>	<u>1420</u>	<u>117</u>	<u>14,4</u>
6L1721H23	6,48E+04	4,69E-04	1230	7,2	2,04E+05	7,29E-03	1220	36	5,0
5L1721H23 6L3	4,75E+04	6,76E-04	1600	14	1,05E+05	0,0428	1360	408	29,1
5L1721H23 6H3	1,13E+05	8,99E-04	615	8,0	3,07E+05	0,0341	460	111	13,9
5L1721H23	6,12E+04	1,41E-03	1380	23	1,02E+05	0,0588	1100	576	25,0
5L1724H23 6L3H3	6,31E+04	8,27E-04	1690	13	2,11E+05	0,0263	1520	125	9,6
5L1724H23 6L3	5,31E+04	2,18E-03	1440	41	1,60E+05	0,121	1100	756	18,4
6L21H2335	8,99E+04	1,72E-02	1340	191	5,26E+05	0,237	502	451	2,4
5L1724H23	-	-	40	-	2,73E+05	2,02E-02	91	74	
5L1724H35	4,43E+04	1,53E-03	164	35	-	-	0	-	

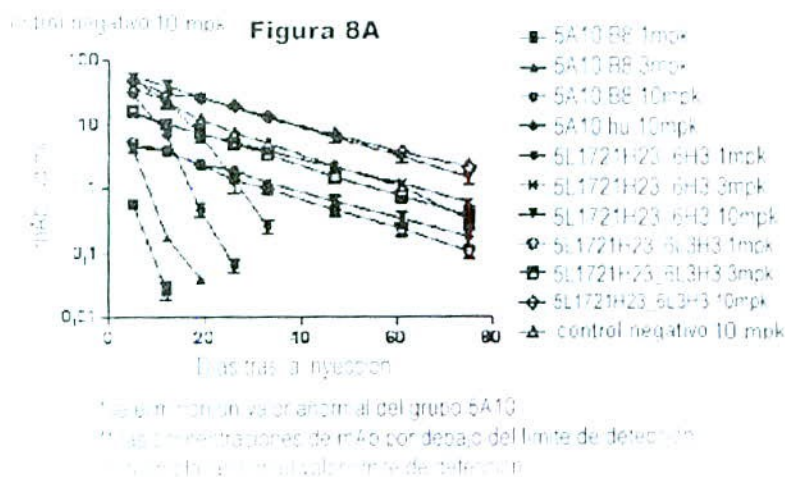
Asimismo, de las Tablas 5 y 6 se evidencia que los anticuerpos de la invención tienen una afinidad de unión (K_D) menor a 20 nanomolar a pH fisiológico. Vale la pena recordar que la afinidad de un anticuerpo por un antígeno (en este caso la proteína PCSK9) es una característica de vital importancia en el campo biomédico, ya que a menor valor de K_D , mayor afinidad del anticuerpo y por tanto mayor actividad terapéutica.

Adicionalmente, en la Tabla 7 (página 118) del Capítulo Descriptivo, se muestra una comparación entre anticuerpos funcionalmente cercanos a los de la presente invención, donde se observa que sólo el de la presente invención (5L1721H23 6L31H3) resulta dependiente del pH, con una relación de K_D a pH 6/pH 7.4 de 13,0, mientras que otros anticuerpos funcionalmente cercanos, como el H1M300N (de la solicitud de patente US2010/0166768) un valor de 1,8. Me permito mostrar dichos resultados a continuación:

Tabla 7. Unión dependiente de pH

Anticuerpo	pH 6,0 (fosfato de sodio)				pH 7,4 (fosfato de sodio)				Razones	
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	K_D (pM)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	K_D (pM)	K_D , pH 6/ K_D , pH 7,4	k_d , pH 6/ k_d , pH 7,4
5A10 WT	$3,31E+05$	$< 6E-5$	< 193	< 181	$2,41E+05$	$< 6E-05$	< 193	< 249		
5L1721H23 6L3113	$3,07E+05$	$2,86E-03$	4,0	9316	$2,42E+05$	$1,74E-04$	66,4	719	13,0	16,4
11M300N	$4,27E+05$	$3,21E-04$	36,0	752	$1,67E+05$	$6,92E-05$	166,9	414	1,8	4,6

Asimismo, llamo la atención de la Examinadora sobre los resultados presentados en la Figura 8A, que muestran una semivida prolongada de los anticuerpos aquí reclamados en comparación con anticuerpos de control que no presentan ninguna dependencia del pH sobre la afinidad de unión.



De esta figura es posible determinar que los anticuerpos con unión dependiente de pH, 5L1721H123_6L13 y 5L1721H123_6L3H13, tienen degradación de anticuerpo reducida y una semivida prolongada comparados con anticuerpos sin unión dependiente de pH. La figura 8B es una gráfica que demuestra que el efecto mostrado en la Figura 8A se debe a degradación mediada por objetivo.

Por consiguiente, no existe indicio alguno en D2 que llevase a la persona medianamente versada en la materia a producir un anticuerpo con las secuencias específicas aquí reclamadas, a tener tan alta afinidad de unión con la PCSK9 humana, a tener afinidad de unión dependiente del pH, y tampoco a presentar degradación reducida del anticuerpo y una semivida prolongada.

D. Deducir el problema técnico a solucionar.

Con base en todo lo anteriormente mencionado respecto al arte previo, el problema técnico de la presente invención, tal como se propone en el Capítulo Descriptivo de esta solicitud, radica en la necesidad de desarrollar anticuerpos altamente afines a la proteína PCSK9, y que la dicha afinidad sea mayor a pH fisiológico que a pH endosómico.

E. Evaluar si la invención reivindicada, partiendo del estado de la técnica cercano y del problema técnico objetivo, habría sido obvia para la persona medianamente versada en la materia.

Evidentemente, el arte previo citado por la Examinadora no brinda las enseñanzas suficientes para que la persona medianamente versada en la materia desarrolle la presente invención sin ambigüedad alguna, puesto que D2 está dirigido al estudio de la actividad inhibidora del anticuerpo 1G08 sobre la proteína PCSK9 con y sin la región C-terminal, lo que mostró que dicha región de la proteína es una parte clave para la inhibición al utilizarse 1G08. Adicionalmente, y como ya mencioné, D2 no divulga la estructura ni la secuencia de aminoácidos que componen el anticuerpo 1G08, por lo que no es posible determinar si los anticuerpos aquí reclamados son estructuralmente similares a los divulgados en D2. Nuevamente, y en vista que los anticuerpos no son comparables estructuralmente, la persona medianamente versada en la materia no encontraría sugerencia o motivación alguna a producir el anticuerpo aquí reclamado con las secuencias específicas señaladas anteriormente, ni mucho menos predecir los resultados sorprendentes e inesperados elucidados por los inventores por medio de trabajo de experimentación exhaustiva.

En este sentido, vale la pena señalar que el Manual Andino de Patentes también establece que las invenciones en el campo de la biotecnología tienen nivel inventivo cuando la composición reclamado tienen una **estructura inesperada** (no derivable por la persona medianamente versada en la materia) o cuando presentan un **uso o efecto sorprendente**.⁴ Por tales razones, es claro que en el presente caso, no sólo las características estructurales de las composiciones reclamados es inesperada, sino también que los efectos técnicos logrado por las mismas, lo que es una clara evidencia de nivel inventivo.

iv) Así, resulta notable que en el momento de la realización del Examen de fondo, la Examinadora no se rigió por lo estipulado en la Guía de la SIC en cuanto la evaluación de nivel inventivo, ya que este debe basarse únicamente en si existen sugerencias explícitas y suficientes en el arte previo para lograr desarrollar de manera obvia los anticuerpos y las composiciones aquí reclamadas, las cuales, como se demostró anteriormente, no existen.

De aceptar el estándar de nivel inventivo de la Examinadora, donde supuestamente el desarrollo de los anticuerpos aquí reclamados es obvio, equivaldría a desdibujar el objetivo principal del sistema de patentes, que es precisamente fomentar la investigación y desarrollo de mejoras incrementales. Nada se inventa de la nada. Necesariamente, la tecnología avanza en pasos discretos constituida por mejoras concretas a lo que se conoce. El sistema de patentes recompensa al inventor que proporciona una solución que no resultaría previsible a partir del estado de la técnica. Lo anterior además quiere decir que el resultado inventivo no podría ser desarrollado sin algún grado de experimentación o que presente resultados inesperados.

En este sentido, el Tribunal Andino de Justicia (TAJ) ha determinado que la divulgación del arte previo utilizada para desvirtuar la patentabilidad de una invención, debe ser lo suficientemente detallada para que una persona medianamente versada en la materia pueda usar dicha información para reproducir y explotar la invención sin acudir a experimentación adicional alguna⁵. Evidentemente, la Examinadora simplemente buscó algunas palabras clave en D2 relacionados con la inhibición de la proteína PCSK9 de la presente invención de la Reivindicación 1, sin explicar de manera coherente, motivada y detallada los argumentos en contra del nivel inventivo.

En conclusión, a la luz de la clara evidencia en favor del nivel inventivo suministrada anteriormente, ni la actividad de los anticuerpos de la invención ni su estructura habrían podido ser dilucidados ni mucho menos previstos a partir de la información aportada por D2. La persona medianamente versada en la materia no habría encontrado sugerencia o motivación

⁴ Manual Andino de Patentes, ISBN-9978-43-855-6. Sección 10.8.1. Páginas 82.

⁵ Proceso 06-IP-89 (<http://intranet.comunidadandina.org/Documentos/Procesos/209-IP-2005.doc>); y Proceso 36-IP-2004 (<http://www.notinet.com.co/serverfiles/servicios/archivos/30jul04/ca36-04.htm>)

alguna que la condujera directamente a desarrollar los anticuerpos aquí reclamados, ni mucho menos con la expectativa de que tuvieran los efectos sorprendentes e inesperados mencionados anteriormente.

v) Adicionalmente, me permito señalar que en el análisis de patentabilidad realizado, la Examinadora aparentemente se limita a señalar que el arte previo citado divulga un anticuerpo inhibidor de PCSK9, simplemente señalando que los anticuerpos de la invención se obtendrían fácilmente con las enseñanzas allí descritas. Sin embargo, parece olvidar que el análisis de nivel inventivo no puede estar basado en si es o no posible obtener la invención reclamada, pues claramente era posible, toda vez que el compuesto de la invención existe y proporciona la actividad biológica mencionada. Esta aproximación propuesta por la Examinadora conllevaría a que ninguna invención sería patentable, volviendo así inoperante el sistema de patentes.

Con base en todo lo anterior, es pertinente preguntarse lo siguiente:

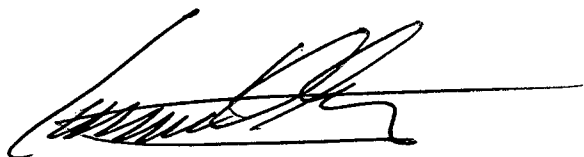
- ¿Cómo es posible sintetizar los anticuerpos de la presente invención, tal y como están definidos según sus secuencias de aminoácidos a partir de las enseñanzas de D2?
- ¿Cómo es posible que partiendo de un arte previo que no divulga estructura alguna de ningún anticuerpo y que divulga anticuerpos que se unen a otro epítipo del de la presente invención va a llegar a lo aquí reclamado sin necesidad de experimentación?
- Específica y experimentalmente ¿Cómo con la práctica rutinaria de la persona medianamente versada en la materia llegaría a la invención únicamente a partir de D2?

En este orden de ideas, es evidente que la Examinadora olvida que la Guía de la SIC dice que *“Una vez formulada una nueva idea, a menudo se puede demostrar teóricamente el modo en el que se podría llegar a ella, a partir de algo conocido, a través de una serie de etapas aparentemente fáciles. El examinador de patentes debe evitar el uso de un análisis ex post facto de este tipo.”*⁶.

⁶ Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad de la SIC , 2014, sección 2.13.6.3, página 137 (disponible en http://api.sic.gov.co/Documentos/Guia_Examen_Patentes.pdf)

6. Por todo lo anterior, considero que las objeciones presentadas por la Examinadora en su primer examen de fondo han sido resueltas y por consiguiente solicito respetuosamente que el Despacho tenga por cumplidos los requisitos de patentabilidad y proceda con la concesión de la patente.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE
C.C. No. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Anexos:

- Capítulo Reivindicatorio Modificado.
- Anexo 1, Artículo: H. Liang et al., "Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Antagonism Reduces Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Statin-Treated Hypercholesterolemic Nonhuman Primates," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 340, no. 2 (Febrero 1, 2012): 228–36, doi:10.1124/jpet.111.187419.
- Recibo de pago por 1 reivindicación adicional.

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

(Primer Examen de Fondo)

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a PCSK9 y comprende una región variable de cadena pesada (VH) una región determinante de la complementariedad (CDR1), una CDR2 de VH y una CDR3 de VH de la secuencia de aminoácidos de VH mostrada en SEC ID N.º: 4 ó 5.
2. El anticuerpo aislado de la Reivindicación 1, que comprende adicionalmente CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera (VL) de la secuencia de aminoácidos de VL mostrada en la SEC ID N.º: 3.
3. El anticuerpo aislado de la Reivindicación 2, en el que la CDR1 de VH tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 6, la CDR2 de VH tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 7, la CDR3 de VH tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 8 ó 9, la CDR1 de VL tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 10, la CDR2 de VL tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º: 11, y la CDR3 de VL tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º: 12.
4. El anticuerpo aislado de la Reivindicación 3, en el que el CDR3 de VH tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 9.
5. El anticuerpo aislado de la Reivindicación 4, en el que el la región de VH comprende SEC ID N.º: 4 o SEC ID N.º: 5 y la región VL comprende SEC ID N.º: 3.
6. El anticuerpo aislado de la Reivindicación 5, en el que la región VH comprende SEC ID N.º: 5.
7. Un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, codificada por el plásmido depositado en la ATCC y que tiene N.º de Acceso de ATCC PTA-10547, o PTA-10548, y/o PTA-10549.
8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7.

9. Una célula huésped que produce recombinantemente el anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7.
10. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7.
11. Un plásmido aislado según se deposita en la ATCC y que tiene N.º de Acceso de ATCC PTA-10547, o PTA-10548, y/o PTA-10549.

Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Antagonism Reduces Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Statin-Treated Hypercholesterolemic Nonhuman Primates^S

Hong Liang, Javier Chaparro-Riggers, Pavel Strop, Tao Geng, Janette E. Sutton, Daniel Tsai, Lanfang Bai, Yasmina Abdiche, Jeanette Dilley, Jessica Yu, Si Wu, B. Michael Chin, Nicole A. Lee, Andrea Rossi, John C. Lin, Arvind Rajpal, Jaume Pons, and David L. Shelton

Novartis Institutes, Pfizer Inc., South San Francisco, California

Received March 29, 2011; accepted October 11, 2011

ABSTRACT

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) promotes the degradation of low-density lipoprotein (LDL) receptor (LDLR) and thereby increases serum LDL-cholesterol (LDL-C). We have developed a humanized monoclonal antibody that recognizes the LDLR binding domain of PCSK9. This antibody, J16, and its precursor mouse antibody, J10, potently inhibit PCSK9 binding to the LDLR extracellular domain and PCSK9-mediated down-regulation of LDLR in vitro. In vivo, J10 effectively reduces serum cholesterol in C57BL/6 mice fed normal

chow. J16 reduces LDL-C in healthy and diet-induced hypercholesterolemic cynomolgous monkeys, but does not significantly affect high-density lipoprotein-cholesterol. Furthermore, J16 greatly lowered LDL-C in hypercholesterolemic monkeys treated with the HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin. Our data demonstrate that anti-PCSK9 antibody is a promising LDL-C-lowering agent that is both efficacious and potentially additive to current therapies.

Introduction

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) has emerged in recent years as a promising therapeutic target for lowering low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C). In humans, gain- and loss-of-function PCSK9 variants associate with hypercholesterolemia or hypocholesterolemia, respectively (Abifadel et al., 2009). These mutations have been found to increase cardiovascular heart disease risk. The homozygous humans who are null for PCSK9 seem to be healthy and normal (Horton et al., 2007; Abifadel et al., 2009).

PCSK9 is a secreted serine protease that is made primarily by the liver and intestine. It consists of a signal peptide, a prodomain, a catalytic domain, and the histidine-rich C-terminal domain. The prodomain is self-cleaved in the endoplasmic reticulum after synthesis and covalently bound to the mature protein thereafter. PCSK9 binds to the epidermal growth factor-like repeat A (EGF-A) domain on LDLR in a calcium-dependent manner (Zhang et al., 2007). X-ray crystallography studies of cocrystals show that a region of the PCSK9 catalytic domain, distinct from the actual catalytic site, makes direct contact with the EGF-A domain (Kwon et al., 2008). Data show that PCSK9 asserts its function primarily through binding to hepatocyte LDLR and preventing LDLR recycling to the cell surface after endocytosis. This results in reduced LDLR levels, decreased cellular uptake of LDL-C, and higher LDL-C levels in blood (reviewed in Horton et al., 2009). Some evidence suggests that this occurs primarily on the cell surface of hepatocytes, after PCSK9 has been secreted. However, it has been suggested that intracellular PCSK9 may target LDLR for degradation before it is chaperoned to the cell surface (Poirier et al., 2009), providing an additional mechanism for reducing LDLR levels. Thus the site of action of PCSK9 in vivo remains an open question.

This work was supported by Pfizer Inc.
All authors' disclosures of interest and conflict of interest information can be found at <http://pet.aspetjournals.org>.
DOI: 10.1177/1074143911412610
This article is available at <http://pet.aspetjournals.org>.
Supplemental material is available at <http://pet.aspetjournals.org>.

KEY WORDS: PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; PCSK9(-/-), PCSK9 knockout; huPCSK9, human PCSK9; LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol; LDLR, LDL receptor; LDL-C, LDL-cholesterol; ECD, extracellular domain; HDL-C, high-density lipoprotein; HDL-C, HDL-cholesterol; HSC, high cholesterol; HF, high fat; TC, total cholesterol; EGF-A, epidermal growth factor-like repeat A; NHP, nonhuman primate; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

reduction of PCSK9 activity via genetic deletion or pharmacological intervention, such as antisense, siRNA, interference, or monoclonal antibodies, has been shown to cause an increase in hepatocyte LDLR and a subsequent reduction in serum LDL-C levels (Rashid et al., 2005; Graham et al., 2007; Frank-Kamenetsky et al., 2008; Chan et al., 2009; Gupta et al., 2010; Ni et al., 2011). Some of these interventions have also been shown to effectively reduce LDL-C and serum lipid levels in nonhuman primates (NHPs) with normal diet.

Statins are currently the most successful and widely used class of therapy for hyperlipidemia. Through inhibiting HMG CoA reductase and cholesterol synthesis, they activate SREBP-2 and subsequently induce LDLR expression. Activated sterol response element binding protein 2 also induces the expression of other genes involved in cholesterol metabolism, including PCSK9. In addition, statins have been shown to up-regulate hepatocyte nuclear factor 1 α , which induces PCSK9 expression (Dong et al., 2010). These increased levels of PCSK9, in turn, increase the degradation of LDLR protein, thus probably dampening the full potential effect of statin treatment (Dubuc et al., 2004; Park et al., 2004). It is therefore speculated that statins and PCSK9 antagonists may have an additive or even synergistic effect on LDL-C levels. Indeed, mice lacking PCSK9 have been shown to be hypersensitive to statins (Rashid et al., 2005). Epidemiological studies have shown increased PCSK9 levels upon statin use and correlated statin responsiveness to PCSK9 loss-of-function mutants (Berge et al., 2006; Thompson et al., 2008; Konrad et al., 2011). Reports also indicated other lipid-lowering therapies, such as fenofibrate and the Niemann-Pick C1-like 1 inhibitor ezetimibe, can increase circulating PCSK9 protein levels (Konrad et al., 2011). Short interfering RNA-mediated knockdown of *Pcsk9* led to a greater reduction in serum non-HDL-C in mice in combination with ezetimibe (Nash et al., 2011), suggesting that a PCSK9 inhibitor may have an additive effect with these major classes of current lipid-lowering medications as well. Population-based studies and pivotal clinical trials have shown that for most people there is a clear heart health benefit of lowering blood LDL-C to levels possibly even lower than the current Adult Treatment Panel III guidelines (reviewed in O'Keefe et al., 2004).

Current therapies, although well tolerated and efficacious in most individuals, are insufficient to provide optimal lowering of LDL-C in a subset of patients because of inadequate efficacy, tolerability, or safety (reviewed in Costet, 2010). Cardiovascular heart disease is still the number one cause of death in the developed world, even with the advent and wide adoption of current lipid-lowering therapies. There is clearly a need for new additive or replacement therapies that are effective and safe.

We have identified a monoclonal antibody, J16, which binds to PCSK9 and neutralizes its effect on LDLR degradation. Structural studies on co-crystals of this antibody bound to PCSK9 show that it binds to the same site on PCSK9 as LDLR. This LDLR-binding site is evolutionally conserved across rodent, NHP, and human, making J16 a potent cross-species PCSK9 inhibitor. By using this antibody in mice and comparing its efficacy to that of genetic deletions we could directly test the hypothesis that little, if any, effect on LDLR is mediated by intracellular PCSK9 under normal physiolog-

ical conditions. We show that J16 effectively reduces serum cholesterol in mice, to a level similar to that observed in PCSK9 knockout [*PCSK9*(-/-)] mice, demonstrating that the majority, if not all, of PCSK9 function in vivo is mediated via circulating PCSK9. We also show that J16 can selectively lower LDL-C in NHPs with normal or elevated cholesterol levels. Finally, we were able to test and confirm the hypothesis that PCSK9 antagonism can provide further LDL-C lowering when coadministered with a statin.

Materials and Methods

Generation of Proteins and Antibodies. Recombinant human PCSK9 protein was produced as described previously (Cunningham et al., 2007). Mouse and cynomolgus PCSK9 protein was produced by cloning the cDNA sequences into mammalian expression vector PRK5 with the addition of a six-His tag at the C terminus, transiently transfected and expressed in human embryonic kidney 293 cells using Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. Recombinant proteins were purified from conditioned media by using a Ni column (QIAGEN, Valencia, CA) and standard techniques. LDLR extracellular domain (ECD) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN).

Mouse antibodies to human PCSK9 were generated by immunizing wild-type BALB/c and 129/BL6 *PCSK9*(-/-) mice (Rashid et al., 2005) with recombinant human PCSK9 (huPCSK9). Immortalized lymphocytes were generated from spleen by fusion with an established cell line by using standard hybridoma technology. Clones were screened for the ability to bind human PCSK9 by ELISA and purified from hybridoma cultures by using monoclonal antibody select beads (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and further screened for effects on huPCSK9-mediated LDLR down-regulation in Huh7 cells by using Western blot analysis (see below).

Mouse antibody J10 was humanized and affinity-matured to antibody J16 by using standard humanization and affinity maturation strategies (Bostrom et al., 2009).

Animal Studies. C57BL/6 mice were purchased from Charles River Breeding Laboratories (Portage, MI); *LDLR*(-/-) and *LDLR*(+/-) mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Mice were acclimated to our facility for 2 weeks before the start of experiments. *PCSK9*(-/-) mice (Rashid et al., 2005) were purchased from The Jackson Laboratory and bred at our facility. Animals were housed conventionally under ambient conditions, with free access to water and standard rodent chow unless otherwise specified. Diets of high fat (HF; 60% kcal fat, 20% kcal protein, and 20% kcal carbohydrate) and HF/high cholesterol (HC) (40% kcal fat, 20% kcal protein, 40% kcal carbohydrate, and 2.8 mg/kcal cholesterol) were purchased from Research Diets (New Brunswick, NJ). Mice were fasted for 4 h before serum samples were collected.

A total of 16 male adult cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*), ranging from 5 to 9 years of age and 4 to 6 kg of weight, were used for the dose response of J16. Animals were randomized based on LDL-C levels at day -7 and weight ($n = 4/\text{group}$). Animals were housed in stainless-steel individual cages and fed ad libitum with Harlan (Indianapolis, IN) Primate Diet 2050 and water, and fasted overnight before plasma samples were collected.

Twelve female adult cynomolgus macaques (*M. fascicularis*), ranging from 3.5 to 4 kg of weight, that were fed a primate high-fat diet (62.1% kcal fat, 21.7% kcal carbohydrate, 16.2% kcal protein, and 0.1 mg/kcal cholesterol) (Harlan Primate Diet TD.06278) for at least 18 months were used in this study. Animals were housed in individual cages and maintained on the high-fat diet with ad libitum access to water. Animals were randomized into three groups based on LDL-C levels at day -7 and weight ($n = 4/\text{group}$). Groups 2 and 3 were administered via oral gavages with rosuvastatin calcium (Crestor; AstraZeneca Pharmaceuticals LP, Wilmington, DE) during study days 1 to 55 as a whole tablet at 10 mg/animal and 10 mg/kg on days

0.5% (w/v) BSA, 0.5% (w/v) bovine serum albumin, 0.5% (w/v) gum Arabic vehicle, Simvastatin (0.5 mg/kg), or 0.5 mg/kg (w/v) simvastatin (Pfizer Inc., New York, NY) were administered to the animals on study days 84 to 133 as a fine suspension in 0.5% gum Arabic vehicle at 50 mg/kg. J16 (3 mg/kg) was administered via intravenous bolus injection in group 1 and 2 mice on day 14 and group 3 animals on day 105. Fasted plasma samples were taken at the indicated time points from days 7 to 133. The anti- α_2 macroglobulin and simvastatin were purchased at a local pharmacy.

All animal procedures were conducted in accordance with our Institutional Animal Care and Use Committees in accordance with standards and Accreditation of Laboratory Animal Care International guidelines.

Plasma samples were analyzed for lipid measurements (cholesterol, HDL-C, LDL-C, and triglyceride) by using the Ace system (Beckman Coulter System) Alfa Wassermann, West Caldwell, NJ. Plasma lipid measurements were analyzed and graphed by using Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

LDL-PCSK9-Mediated Down-Regulation of LDLR in Huh7 Cells. Huh7 cells were allowed to grow to approximately 80% confluence in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 4 mM glutamine. Cells were then changed to one containing 10% delipidated fetal bovine serum for 8 to 10 d to induce LDLR expression. Cells were then seeded for 6 to 10 d in 293 expression media supplemented with 10% FBS. Human or mouse PCSK9, with or without test antibody, were added with lysis buffer (50 mM glycerol phosphate, 10 mM HEPES, pH 7.4, 1% Triton X-100, 20 mM NaCl, and a cocktail of protease inhibitors (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN) by shaking at 300 rpm. Cell lysates were collected and analyzed for LDLR protein levels via Western blot analysis.

PCSK9 and LDLR Binding Assay. Recombinant mouse or human PCSK9 protein was biotinylated by using a biotinylation kit (Pierce and Warriner, Rockford, IL). Standard ELISA techniques were used to coat ELISA plates (EIA-Block, block, wash, and incubate with the indicated amount of biotinylated PCSK9. LDLR-PCSK9 binding was measured by adding 50 μ l of 1% formaldehyde + 4% sucrose + 0.1% BSA buffer to plate solution for 1 min. Plates were detected by using horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Invitrogen), with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate, and signal was read at 450 nm.

Western Blot Analysis. Western blot analysis of liver and Huh7 cells was performed by using either goat anti-mouse LDLR antibody (R&D Systems), mouse anti-human LDLR antibody (R&D Systems), or goat anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antibody (R&D Systems). Signal was detected by using Pierce enhanced chemiluminescence Western blot substrate (Thermo Fisher Scientific). Bands were quantified by using ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Affinity Determination of Antibodies. The binding kinetics of a panel of PCSK9 antibodies, J10 and J16, to recombinant human cynomolgus monkey, and mouse PCSK9 were measured on a Biacore 2000 resonance resonance Biacore 2000 biosensor (GE Healthcare, Little Chalfont, Bucks, Bucks, UK). The binding affinity of J10 to recombinant human PCSK9 was also determined by using a Biacore 2000 biosensor (Biacore Inc., Boise, ID). Details of the assay are provided in the supplemental information.

Crystallization, Data Collection, and Refinement. hPCSK9: J16 recombinant crystals were grown by the hanging drop method at 4°C using a precipitant solution containing 100 mM HEPES, pH 7.0, 0.1 M 2-mercaptoethanol, 15% glycerol, 1000 mM plate-shaped crystals appeared in 1–2 d and were cryoprotected with 2-methyl-2,4-dinitrobenzoic acid. Crystals were flash frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at Advanced Light Source beamline 5.0.2. The crystals were cryo-cooled in a stream of P_2 with unit cell dimensions $a = 82.4$ Å, $b = 100.4$ Å, and $c = 106.4$ Å, and were diffracted to 2.75-Å resolution (supplemental Table S1). All diffraction data were processed with XDS and Scalepack (Kabsch and Moras, 1997). The PCSK9:J16 complex was solved by molec-

ular replacement using PCSK9 structure (PDB ID code 2P4E) (Cunningham et al., 2007) and a model of J16 Fab using Phaser (McCoy et al., 2005). Alternate cycles of model building using the program Coot (Emsley and Cowtan, 2004), positional, translation-libration-screw, and individual restrained thermal factor refinement in Refmac (Murshudov et al., 1997), and addition of water molecules reduced the R and free R values to 22.5 and 28.2%, respectively, for all of the reflections. The coordinates for the structure have been deposited in the Protein Data Bank (PDB ID code 3SQQ).

Epitope Identification and Buried Area Calculations. The epitope residues for J16 on the PCSK9 protein were identified by calculating the difference in accessible surface area between the hPCSK9:J16 crystal structure and PCSK9 structure alone. PCSK9 residues that show buried surface area upon complex formation with J16 were defined as being part of the epitope. The solvent-accessible surface of a protein was defined as the locus of the center of a probe sphere (representing a solvent molecule of 1.4-Å radius) as it rolls over the Van der Waals surface of the protein. The solvent-accessible surface area was calculated by generating surface points on an extended sphere about each atom (at a distance from the atom center equal to the sum of the atom and probe radii), and eliminating those that lied within equivalent spheres associated with neighboring atoms as implemented in the program AREAIMOL (http://www.ccp4.ac.uk/newsletters/newsletter38/03_surfarea.html).

Results

Identification of Antagonistic Anti-PCSK9 Antibodies. We screened for anti-PCSK9 monoclonal antibodies among hybridoma cell lines generated by fusing the spleen of various wild-type and *PCSK9*($-/-$) mice immunized with recombinant huPCSK9 protein. More than 800 antibodies that were positive for PCSK9 binding by ELISA were tested for their ability to block recombinant huPCSK9-mediated LDLR degradation in Huh7 cells. Approximately 60 clones (7%) showed some degree of recovery of LDLR protein levels in the presence of PCSK9. Only four antibodies produced by hybridoma cell lines showed complete block of PCSK9 activity. It is noteworthy that all of these were obtained from *PCSK9*($-/-$) mice and all were also cross-reactive to mouse PCSK9. These four can mutually block each other's binding to PCSK9 in ELISA and biosensor assays, indicating that they share overlapping epitopes. One of them, J10, binds to recombinant human, cynomolgus monkey, and mouse PCSK9 with approximate affinities of 0.3, 0.5, and 2.7 nM, respectively, as determined by biosensor binding assays (Supplemental Fig. 1). Figure 1A shows J10 was able to completely rescue LDLR levels in Huh7 cells treated with exogenous mouse and human PCSK9. J10 also completely and dose-dependently blocked binding of 1.4 nM human PCSK9 to immobilized human LDLR ECD with an IC_{50} of 1 nM (Fig. 1B).

We engineered J10 into a human IgG2deltaA (Armour et al., 2002) and κ chain antibody and further improved its antigen binding affinity. The resulting antibody, J16, contains fully human sequence outside of the complementarity determining regions. It binds to recombinant human PCSK9 molecules with a K_D of approximately 5 pM as determined by KinExA (Supplemental Fig. 2), to cynomolgus monkey with K_D to less than 100 pM, and to mouse PCSK9 with K_D of 35 pM, as determined by biosensor binding assays (Supplemental Fig. 1). J16 completely blocks human and mouse PCSK9 binding to immobilized LDLR ECD and can fully reverse the PCSK9-mediated LDLR suppression in Huh7 cells.

RESULTS

Table 1 shows the TC, LDL-C, and HDL-C levels (mg/dl) $\pm$ S.E. in mice fed normal chow treated with 10 mg/kg J10 and vehicle control through intravenous injection.

As depicted in Table 1, mice fed a regular diet and measured for lipid concentrations ($n = 9$ –10/group). LDL-C in wild-type mice was under the detection limit.

Treatments	n	Vehicle-Treated			J10-Treated		
		TC	HDL-C	LDL-C	TC	HDL-C	LDL-C
WT type	9	92.5 $\pm$ 2.5 ^a	58.4 $\pm$ 1.4	N.A.	49.7 $\pm$ 2.0 ^b	33.4 $\pm$ 0.9 ^b	N.A.
LDL-C ⁺ type	9	123.1 $\pm$ 1.7	70.2 $\pm$ 1.1	32.2 $\pm$ 2.1	96.0 $\pm$ 2.6 ^b	61.1 $\pm$ 1.4 ^b	9.7 $\pm$ 1.6
LDL-C ⁺ type	9	253.6 $\pm$ 11.2 ^c	77.8 $\pm$ 2.5	139.6 $\pm$ 8.7	266.5 $\pm$ 9.9	82.3 $\pm$ 2.2	145.7 $\pm$ 9.4

N.A., not available.

^a Control compared with vehicle-treated group.

To understand the differential effect of PCSK9 inhibition on HDL- and LDL-cholesterol in primates, we administered low-dosed J16 into cynomolgus monkeys fed a normal diet.

Figure 3 shows J16 administered as a single intravenous dose at 0.1, 1, 3, and 10 mg/kg ($n = 4$ /group). J16 significantly and rapidly reduced LDL-cholesterol at all doses (Fig. 3A). The magnitude, duration, and accumulative percentage reduction over time calculated by area under the curve of the LDL-C lowering was dose-dependent (Fig. 3A; Supplemental Fig. 4). Administration of 0.1 mg/kg J16 caused a transient 50% drop in LDL-cholesterol levels at day 2 that quickly recovered by day 5. Dosing at 1 mg/kg reached a maximum effect of 71% reduction in LDL-cholesterol on day 5 and began to recover immediately thereafter, reaching predose levels by day 14. Dosing at 3 and 10 mg/kg maintained the 70% reduction in LDL-cholesterol levels until days 10 and 21 postdosing, respectively. Total cholesterol levels were also significantly reduced in all dosing groups, with a dose response and time course similar to that of LDL-C and a maximum reduction seen in the 10 mg/kg group (up to 39%) lasting 21 days. There were no dose-related changes observed in HDL-cholesterol (Fig. 3B) or triglyceride levels throughout the study.

Effect of Anti-PCSK9 Antibodies in Hypercholesterolemic Models. We tested the effect of anti-PCSK9 antibodies on mice fed a HF diet (60% kcal fat) or a HF/HC diet (40% kcal fat with 2.8 mg/kcal cholesterol). Six-week-old C57BL/6 mice were fed HF or HF/HC diets for 6 weeks before the antibody treatments, which raised total cholesterol to 135 $\pm$ 10 mg/dl and 190 $\pm$ 10 mg/dl, respectively, compared with the $\sim$ 90 mg/dl we typically observe for animals fed normal chow. A single 10 mg/kg injection of J10 was given to mice fed a HF diet, and three consecutive weekly injections at 10 mg/kg were given to mice fed a HF/HC diet. To our surprise, neither treatment group had a significant effect on serum total cholesterol, HDL-C, or LDL-C (Supplemental Tables S1 and S2). Furthermore, PCSK9^{−/−} mice fed a high-fat/high-cholesterol diet also did not exhibit reduced cholesterol levels compared with those on normal chow in our hands (Supplemental Fig. 5). We then further investigate the cause of the unresponsiveness of a HF diet-induced hypercholesterolemic mice to PCSK9 antibodies. First, we measured serum PCSK9 concentrations in the animals. Serum PCSK9 was reduced by 64% in mice fed a HF diet for 6 weeks (14.4 $\pm$ 1.6 ng/ml) compared with those on normal chow (40.4 $\pm$ 4.6 ng/ml) ($n = 5$ /group).

We then investigated the efficacy of J16 in hypercholesterolemic nonhuman primates. Before the initiation of the study, the LDL-C levels of a cohort of cynomolgus monkeys were elevated to an average of 120 mg/dl, compared with the normal average levels of 50 mg/dl, by feeding them a diet

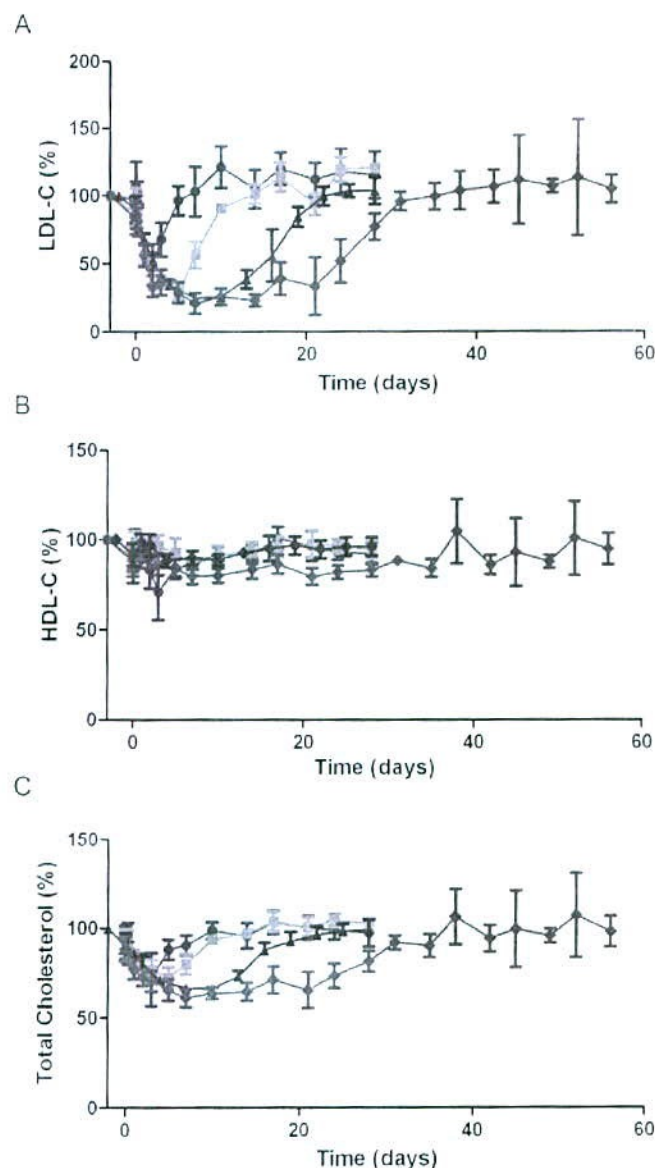


Fig. 3. Dose response of J16 in cynomolgus monkeys. Percentages of LDL-C (A), HDL-C (B), and total cholesterol (C) compared with baseline levels at day -3 in cynomolgus monkeys were plotted. Animals were treated with J16 at 0.1 mg/kg (red circles), 1 mg/kg (green squares), 3 mg/kg (blue triangles), or 10 mg/kg (purple diamonds) on day 0 via intravenous injection. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ($n = 4$ /group).

containing 62% kcal fat and 0.1 mg/kcal cholesterol for more than 18 months. A single dose of 3 mg/kg J16 administered to these animals effectively lowered serum LDL-C levels by 64%

of LDL-C post-treatment, serum LDL-C levels gradually returned to predosing levels by approximately 2.5 to 3 weeks post-treatment (Fig. 4A). The percentage of reduction and the time course of the effect were very similar to that observed in cynomolgus fed normal chow and treated with the same dose (3 mg/kg) of J16 (Fig. 3A). HDL-C levels were not affected by the treatment (Fig. 4B). Total cholesterol followed a similar time course as LDL-C, with maximum lowering of 41% (Fig. 4C). There were no significant changes related to J16 treatment on fasting triglyceride levels throughout the study.

J16 Reduces LDL-C in Statin-Treated Hypercholesterolemic Monkeys. To test the pharmacodynamic interactions between J16 and HMG-CoA reductase-inhibiting statins, we administered rosuvastatin calcium or simvastatin daily to hypercholesterolemic monkeys. We were surprised to find that no effect was observed on the serum levels of total cholesterol or LDL-C after the daily administration of a low dose (10 mg/kg) of rosuvastatin calcium for 6 weeks or a subsequent daily administration of a high dose (20 mg/kg) for 2 weeks. Liquid chromatography-mass spectrometry was used to measure plasma rosuvastatin concentrations (Martin et al., 2002). Rosuvastatin (4 ± 4 and 23 ± 12 ng/ml) was detected in plasma samples taken on day 10 of low or high rosuvastatin calcium dosing, respectively, confirming proper drug exposure in these animals. Upon switching the animals to daily administration of a high dose (50 mg/kg) of simvastatin, their LDL-C levels reached a maximal reduction of 78% at day 5 and stabilized thereafter (Fig. 4D). After 3 weeks of 50 mg/kg/day simvastatin administration, these animals were treated with vehicle or a single dose of 3 mg/kg of J16 while still receiving 50 mg/kg/day simvastatin. J16 dosing caused an additional 65% reduction in LDL-C by day 5 and returned to predosing levels within 2 weeks (Fig. 4D),

demonstrating that the PCSK9 antagonist can greatly reduce LDL-C levels on top of a statin. Daily simvastatin treatment caused a trend of gradual reduction in HDL-C. Treatment of J16 had no significant effect on HDL-C levels (Fig. 4E). Total cholesterol levels gradually reduced after daily simvastatin treatment, reaching a maximal 42% reduction at day 14. Single injection of J16 produced an additional 36% maximal lowering 5 days after dosing (Fig. 4F). The animals were closely monitored throughout the duration of the study for clinical signs, body weight, food intake, hematology, and serum chemistry. No meaningful changes related to rosuvastatin calcium, simvastatin, or J16 treatment were observed. More specifically, liver function, as judged by serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase levels, and kidney function, as judged by serum creatinine, urea, and electrolytes levels, were not altered by statin or J16 treatment.

Discussion

Since the discovery of its role in cholesterol metabolism and LDLR regulation and the realization that PCSK9 is a promising therapeutic target for LDL-C lowering, the domains and structures important for PCSK9 function have been under intense investigation. The protease activity has been shown to be necessary for self-cleavage, folding, and secretion of the mature PCSK9 protein, but it is not involved in LDLR degradation (Li et al., 2007; McNutt et al., 2007). The binding epitope of PCSK9 to EGF-A of the LDLR has been localized to a conserved patch on the catalytic domain (Cameron et al., 2008; Kwon et al., 2008). The prodomain and the C terminus have also been implicated in PCSK9 activity or even direct binding to LDLR (Kwon et al., 2008; Mayer et

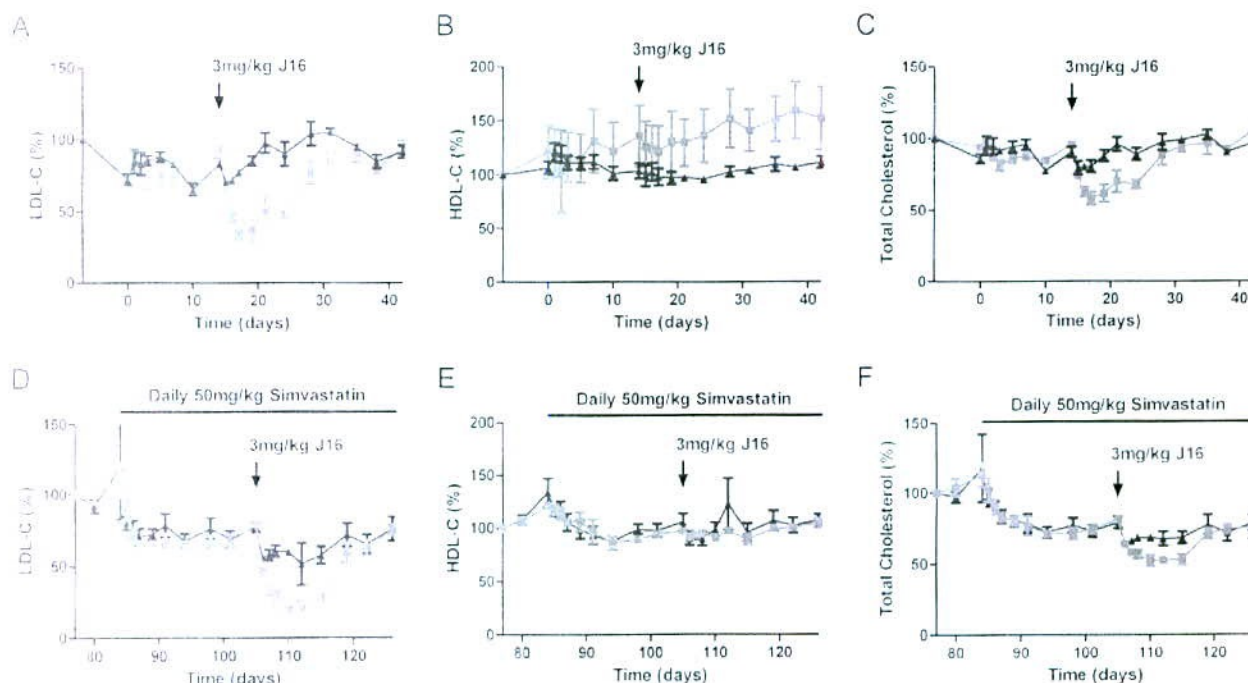


Fig. 4. Effect of J16 on hypercholesterolemic cynomolgus monkeys. Percentages of LDL-C (A and D), HDL-C (B and E), and total cholesterol (C and F) of cynomolgus monkeys at baseline levels at day 0 (A–C) and day 77 (D–F) were plotted. A to C, hypercholesterolemic cynomolgus monkeys treated with 3 mg/kg J16 (open squares) and vehicle (red triangles) on day 14 via intravenous injection. D to F, hypercholesterolemic cynomolgus monkeys treated with 3 mg/kg J16 (open squares) or vehicle (blue triangles) on day 105 via intravenous injection on top of daily 50 mg/kg simvastatin treatment from day 80 to day 120. Results are expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 4$ /group).

Li, 2008; Zhang et al., 2008). Self-association through an endogenous mechanism has been observed to enhance the LDLR-degrading activity (Fan et al., 2008).

We have searched for complete blockers for PCSK9 among more than 800 ELISA-positive antibodies. Although approximately 7% of antibodies showed some blocking activity, only a few blockers that can fully inhibit PCSK9 function were located only from immunizations in a *PCSK9*^{-/-} mouse. Of all these antibodies was humanized and affinity-matured and the X-ray structure of the Fab/PCSK9 complex showing the antibody binds to a three-dimensional epitope that is nearly identical to that of the EGF-A domain of LDLR. These results suggest that the LDLR binding epitope is critically involved in antagonizing PCSK9 function. This epitope is well conserved from invertebrate to vertebrate (Liang et al., 2008), hence it may be difficult to raise antibodies against it in wild-type mice. In fact, the residues of the EGF-A epitope on PCSK9 are 100% identical between mouse and human PCSK9, compared with the 78% overall identity in the 69% identity of the remaining surface residues. Our experience demonstrates the power of using knockout mice in generating functional antibodies. Consistent with our observations, monoclonal antibodies that have been reported to have potent PCSK9 blocking activities sterically block the binding of LDLR (Chan et al., 2009; Duff et al., 2009; Ni et al., 2011). One of these antibodies was generated by screening of human libraries; another was generated in mice engineered to express fully human antibodies, suggesting the immune response and repertoire of these "humanized" mice are distinct from that of a wild-type mouse.

The critical cellular location where PCSK9 asserts its function under physiological conditions is still not clearly established. Many studies have demonstrated an important role of secreted PCSK9 in LDLR down-regulation. In vitro, recombinant PCSK9 binds to LDLR ECD (Cunningham et al., 2007) and exogenous PCSK9 protein effectively reduces both LDLR protein levels and LDL uptake in cultured cells (Lagace et al., 2005; Maxwell et al., 2005). In vivo, injection or infusion of recombinant PCSK9 or blood from paired parabiotic mice over-expressing PCSK9 as a transgene can reduce LDLR protein levels in the liver and consequently elevate cholesterol in mice (Lagace et al., 2006; Grefhorst et al., 2008; Wang et al., 2008).

Evidence also points to the ability of intracellular PCSK9 to degrade LDLR. Although inhibition of PCSK9 using a neutralizing antibody can reduce LDL cholesterol in nonhuman animals by 80%, a level that might be expected for a near complete inhibition of PCSK9 function, the same antibody, with 160 pM binding affinity to mouse PCSK9, only showed partial reduction of total cholesterol in mice (approximately 36% compared with the reported 52% for the *PCSK9*^{-/-} mice) (Rashid et al., 2005; Chan et al., 2009). In addition, an antibody-mediated reversal of the PCSK9 effect on LDL uptake was lower in cultured cells when PCSK9 was over-expressed in the cells rather than being added exogenously as a purified protein (Duff et al., 2009). Overexpression of PCSK9 in HepG2 cells has been shown to increase the degradation of the precursor LDLR in addition to mature LDLR (Maxwell et al., 2005). Moreover, transfection of a PCSK9-expressing construct can reduce LDLR levels in *PCSK9*-expressing cells, but not in surrounding nontransfected cells (Porrier et al., 2009). Finally, two PCSK9 mu-

nants, S127R and D129G, were reported to have reduced or apparently abolished secretion but they are associated with familial hypercholesterolemia, strongly implying that intracellular PCSK9 can still participate in LDLR degradation (Benjannet et al., 2006; Cameron et al., 2006; Homer et al., 2008). In our experiments, the degree of reduction (46%) in J10-treated mice was very similar to that observed in *PCSK9*^{-/-} mice in our hands (45%) and reported by others (52%) (Rashid et al., 2005), as well as that reported for antisense knockdown of PCSK9 (50%) (Graham et al., 2007; Frank-Kamenetsky et al., 2008; Gupta et al., 2010). We show that this reduction in serum cholesterol is through PCSK9 inhibition and, consequently, LDLR up-regulation, because J10 does not have any detectable effect in mice lacking LDLR, and LDLR protein level is increased in J10-treated animals compared with controls. Because we are not aware of evidence suggesting antibodies can interfere with the intracellular function of a protein, our results indicate that neutralizing circulating PCSK9 via a monoclonal antibody can remove most PCSK9 function under normal physiological conditions and strongly suggest that the vast majority, if not all, of PCSK9 mediated cholesterol modulation effect is carried out via secreted PCSK9, at least in the mouse.

We show that PCSK9 antagonism can effectively lower LDL-C levels without significantly affecting HDL-C or triglyceride levels in both normal and hypercholesterolemic monkeys. Although several means of PCSK9 antagonism have been reported to reduce LDL-C levels by 50 to 80% in normal monkeys (Frank-Kamenetsky et al., 2008; Chan et al., 2009; Ni et al., 2011), we show for the first time that PCSK9 antagonism is effective in a hypercholesterolemic monkey model caused by a long-term high-fat diet. An antisense oligo-specific to mouse PCSK9 has been reported to reduce serum cholesterol by 53% in mice fed a Western diet (60% lard) (Graham et al., 2007). However, our anti-PCSK9 monoclonal antibody had no significant effect on mice fed HF or HF/HC diets, nor did we see a significant difference in *PCSK9*^{-/-} fed a HF/HC diet. Differences in diet, experimental conditions, and housing conditions may be responsible for this discrepancy. In our case, the HF diet decreased serum PCSK9 levels by 64%, possibly partly explaining the lack of effect of further PCSK9 inhibition or knockout in diet-induced hypercholesterolemic mice. Our data are also consistent with reports that dietary cholesterol inhibits PCSK9 expression in rat liver (Persson et al., 2009). Unlike rodents where hypercholesterolemia caused by a diet high in cholesterol suppresses PCSK9 levels, studies have found that hypercholesterolemic humans have elevated PCSK9 levels (Lakoski et al., 2009; Welder et al., 2010). It is likely that the unresponsiveness to diet-induced hypercholesterolemia is a property of rodents but not primates, because we have shown that both the degree and duration of LDL-C reduction are similar in normal and hypercholesterolemic monkeys treated with the same dose of the antagonistic PCSK9 antibody J16.

Finally, we show that PCSK9 antagonism results in effective LDL-C in statin-treated hyperlipidemic monkeys. It is noteworthy that one of the most potent statins commercially available, rosuvastatin, had no effect on plasma cholesterol levels in these monkeys with a daily dose of 20 mg/kg. Treatment with a high dose (50 mg/kg/day) of simvastatin caused a 43% reduction in LDL-C and a 32% reduction in HDL-C. Addition of a single administration of J16 on top of simva-

monkeys, treatment caused an additional 65% lowering of LDL-C. The significant effect on HDL-C. The percentage of HDL-C loss was similar to the 64% lowering observed with J16 monotherapy in these monkeys, demonstrating a potential additive effect of treatment with a PCSK9 monoclonal antibody paired with that of statin. It is noteworthy that we have not observed any significant changes related to statin or J16 treatment in body weight, clinical signs, and liver or kidney function throughout the study. Our results provide further confidence that PCSK9 antagonism, particularly anti-PCSK9 monoclonal antibodies, can be a promising new lipid-modifying therapy that warrants further clinical testing.

Acknowledgments

The authors thank Shreshth Shendhkar, Julie Hawkins, Yuli Wang, Kieran O'Sullivan, and Xinyang Qiu for protocols, recombinant human PCSK9 protein, and discussions; Leila Boustany for assistance with construct generation, manuscript editing, and discussions; Kathy Li, G. and Zhi-Ming for assistance with mouse hybridoma work; Tom Martin for assistance in expressing J16; Daniel Malashock, Thomas Peng, and Kevin Lindquist for assistance with biosensor assays; and Tom Todor, Joohee Choi, Ariel Pios, German Vergara, Ikem Takahashi, Ronald Ong, Teresa Rodcliffe, and Gustavo Ruiz for assistance with animal work.

Authorship Contributions

Conceptualization, research design: Liang, Strop, Abdiche, Lin, Raju, and Horton.

Statistical analysis: Liang, Chaparro-Riggers, Strop, Geng, Strop, Raju, Raj, Dilley, Yu, and Wu.

Provisional assay reagents or analytic tools: Abdiche, Chin, and Lin.

Biostatistical data analysis: Liang, Strop, Abdiche, and Rossi.

References

1. Nordestgaard BG, Vasekova M, Benn M, et al. (2002) Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) gene in cholesterol metabolism and disease. *Hum Mol Genet* 11:263–274.
2. Cohen JC, Aboleno V, Williams LM, et al. (2002) The contrasting effects of genetic disruption of human and herpes simplex virus 1c receptors. *J Biol Chem* 277:10550–10554.
3. Cohen JC, Dooley DP, Xu Y, et al. (2004) Secretion of PCSK9 by liver and its regulation by statins. *J Lipid Res* 45:679–687.
4. Cohen JC, Smith AD, Hangolin J, Nasrany N, and Seidah NG (2006) The proprotein convertase PC9/PCSK9 is modulated by form and PCSK9A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J Biol Chem* 281:3051–3057.
5. Cohen JC, Smith AD, and Horton TP (2006) Missense mutations in the PCSK9 gene are associated with hypercholesterolemia and possibly increased response to statin treatment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:4094–4100.
6. Cohen JC, Smith AD, Raju J, and Foltz G (2009) Improving antibody binding affinity to PCSK9 by iterative development. *Methods Mol Biol* 525:373–376.
7. Cohen JC, Smith AD, Raju J, et al. (2009) The structure of PCSK9 reveals a conserved active site. *J Biol Chem* 284:1121–1123.
8. Cohen JC, Smith AD, Raju J, et al. (2006) A PCSK9-binding antibody that neutralizes the cell surface LDL receptors. *Hum Mol Genet* 15:1551–1556.
9. Cohen JC, Smith AD, Raju J, et al. (2007) A PCSK9-binding antibody that neutralizes the cell surface LDL receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1551–1556.
10. Cohen JC (2010) Molecular pathways and agents for lowering LDL cholesterol in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 55:263–278.
11. Cohen JC, Smith AD, Raju J, et al. (2007) Structural and functional studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* 14:413–419.
12. Cohen JC, Smith AD, Raju J, et al. (2007) Structural and functional studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* 14:413–419.
13. Cohen JC, Smith AD, Raju J, et al. (2007) Structural and functional studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* 14:413–419.
14. Cohen JC, Smith AD, Raju J, et al. (2007) Structural and functional studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* 14:413–419.
15. Cohen JC, Smith AD, Raju J, et al. (2007) Structural and functional studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* 14:413–419.
16. Cohen JC, Smith AD, Raju J, et al. (2007) Structural and functional studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* 14:413–419.
17. Cohen JC, Smith AD, Raju J, et al. (2007) Structural and functional studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* 14:413–419.
18. Cohen JC, Smith AD, Raju J, et al. (2007) Structural and functional studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* 14:413–419.
19. Cohen JC, Smith AD, Raju J, et al. (2007) Structural and functional studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* 14:413–419.
20. Cohen JC, Smith AD, Raju J, et al. (2007) Structural and functional studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* 14:413–419.

10. Liang H, Garuti R, Cohen JC, Hobbs HH (2003) PCSK9 induces low-density lipoprotein receptor degradation: evidence of a correlation with plasma cholesterol. *J Biol Chem* **278**:28856–28864.
11. Liang H, Garuti R, Cohen JC, Anderson NN, Rudenkov Y, He YK, Hammer RE, Horton JD (2005) Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to diet-induced obesity in PCSK9-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:5374–5379.
12. Garuti R, Liang H, Cohen JC, Wang XW, Liu A, Kowala M, Alborn WE, Konrad RJ, Hobbs HH (2005) Secreted α -glucosidase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) induces degradation of low-density lipoprotein receptors in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:5650–5654.
13. Liang H, Garuti R, Wang XW, Tang WJ, Hobbs HH, Cohen JC, He YK, Hovingh GK, and Horton JD (2006) Comprehensive whole-genome and candidate gene analysis for plasma triglyceride levels in the Framingham New Targets (FNT) cohort. *Circ Res* **98**:2217–2224.
14. Liang H, Garuti R, Cohen JC, MA, Tang WJ, Cao G, and Konrad RJ (2010) High-dose atorvastatin causes a rapid sustained increase in human serum PCSK9 and disrupts its correlation with LDL cholesterol. *J Lipid Res* **51**:2714–2721.
15. Zhang DW, Garuti R, Tang WJ, Cohen JC, and Hobbs HH (2008) Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:13045–13050.
16. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, Cohen JC, and Hobbs HH (2007) Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem* **282**:18602–18612.

Address correspondence to: Hong Liang, Rinat Laboratories, Pfizer Inc., 220 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080. E-mail: hong.liang@pfizer.com

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0075425

Bogotá D.C., Julio 17 de 2014 - 14:57:08

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS

NI 830.122.870

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	66016	24/06/2014		10.000.00
RECIBO DE CA	999999999	66808	25/06/2014		4.000.00
RECIBO DE CA	999999999	72122	09/07/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	72487	10/07/2014		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	74984	16/07/2014		5.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO

CONCEPTO

Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO

1 50005-01-01 SOLICITUDES

1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA
ADICIONAL A LAS 10 INIC

31.000.00

31.000.00

\$31.000.00

SON: **TREINTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-155949- -00006-0000

Fecha: 2014-07-28 16:54:51

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11. PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act 523 RESPUESTA

Folios: 25

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 17 de 2014 - 14:57:10