

As. 113.937

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-067350- -00012-0000

Fecha: 2013-05-23 15:48:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 31

Señor

**DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

E.

S.

D.

REF: Expediente No. **10-67350-** solicitud de patente de invención a favor de **PEREGRINE PHARMACEUTICALS, INC. y AFFITECH RESEARCHS AS** Título **COMPOSICIONES DE ANTICUERPO ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR Y MÉTODOS**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta al oficio número 451 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado por fijación en lista el 22 de Enero de 2013.

Como primera medida, queremos aclarar al señor Examinador que **si** se presentó en su debido término la respuesta a la Oposición de la sociedad LAFRANCOL S.A, y que de igual manera se canceló el valor correspondiente a las 50 reivindicaciones en exceso de la solicitud inicial.

Para referencia del señor Examinador, adjuntamos copia de la respuesta a la oposición radicada el 19 de diciembre de 2011, así como copia del correspondiente recibo de pago No. 10-26,241 equivalente a \$1.300.000 (50 * \$ 26.000). Así mismo, adjuntamos copia del petitorio en donde se hace referencia a dicho recibo.

Ahora bien, con el ánimo de subsanar las objeciones planteadas por el señor Examinador, nos permitimos presentar un nuevo pliego reivindicatorio compuesto por treinta y seis (36) reivindicaciones, en donde no se amplía en ningún momento la materia inicialmente

divulgada, y se encuentra enteramente sustentado en la descripción. Adjuntamos el recibo correspondiente a las reivindicaciones adicionales, aunque consideramos que este no debería cancelarse en vista de que la señora examinadora no estudió la totalidad de las reivindicaciones adicionales (50) de la solicitud inicial, aun cuando dicho pago si se efectuó en su momento tal como se expuso previamente.

Ahora bien, las reivindicaciones señaladas por corresponder a excepciones a la patentabilidad, han sido eliminadas en el nuevo pliego reivindicatorio con el fin de dar cumplimiento a los requerimientos de su Despacho. Por tanto, el pliego presentado es completamente patentable.

Claridad

La nueva reivindicación 1 ha sido modificada de manera tal que presenta una caracterización del anticuerpo objeto de la presente invención, mediante la debida especificación de las seis secuencias de CDRs que caracterizan a las regiones variables del mismo. Así las cosas, la nueva reivindicación establece que el anticuerpo aislado que se une a VEGF comprende los siguientes CDRs:

- (a) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,*
- (b) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y*
- (c) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y*
- (d) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,*
- (e) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y*
- (f) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,*

lo cual se encuentra debidamente sustentado en la anterior reivindicación 4.

Adicionalmente, la nueva reivindicación 1 fue modificada con el fin de hacer claridad en que dicho anticuerpo aislado:

- (i) se une al menos a VEGF humano y a VEGF de ratón, e*
- (ii) inhibe significativamente la unión de VEGF al receptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) sin inhibir significativamente la unión de VEGF al receptor VEGFR1 (Flt-1).*

lo cual encuentra entero sustento en la materia revelada por las anteriores reivindicaciones 18 y 20, y por la descripción en las páginas 5, 15 y 16 (publicación PCT).

En este sentido, el anticuerpo revelado se encuentra debidamente caracterizado por su estructura y sus efectos biológicos, lo cual cumple enteramente con los requisitos de su Despacho.

Ahora bien, la reivindicación 1 hace referencia adicionalmente a las secuencias sustancialmente homologas de los respectivos CDRs y señala que,

*en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene **1, 2 o 3** sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de CDR dada, o en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones de aminoácidos conservativas de la secuencia de CDR dada,*

lo cual al ser interpretado a la luz de las secuencias específicas dadas (CDRs) va acorde con el derecho con el que cuenta el solicitante de proteger su invención en contra de terceros, que con la intención de no infringir el derecho perseguido, buscarían la realización de modificaciones triviales de las secuencias de aminoácidos conservando así las propiedades del anticuerpo reivindicado.

De igual manera consideramos que la referencia a las secuencias sustancialmente homologas es un justo reconocimiento a la extensa investigación llevada a cabo por el solicitante, y que ha supuesto el desarrollo del anticuerpo reivindicado. De no permitirse esta terminología en la reivindicación 1, los competidores podrían diseñar anticuerpos con

actividad muy similar a la del anticuerpo reivindicado mediante la sustitución o reemplazo de pequeñas fracciones o residuos de aminoácidos.

En este sentido, consideramos fundamental tener en cuenta que cualquier versado en la materia esperaría razonablemente que las variantes del anticuerpo revelado por la reivindicación 1 presentarán las mismas propiedades funcionales de interés, es decir,:

- (i) unión al menos a VEGF humano y a VEGF de ratón, e
- (ii) inhibición significativa de la unión de VEGF al receptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) sin inhibir significativamente la unión de VEGF al receptor VEGFR1 (Flt-1).

motivo por el cual dicho versado se encontraría en capacidad para llevar a cabo ensayos bien conocidos que le permitan identificar cuales variantes del anticuerpo cuentan con la capacidad de unirse al VEGF humano y murino, y de inhibir significativamente la unión de VEGF al receptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) sin inhibir significativamente la unión de VEGF al receptor VEGFR1 (Flt-1), mediante **experimentación rutinaria** sin requerir de la aplicación de actividad inventiva, más aún al tener en cuenta que la descripción cuenta con el sustento requerido para:

- (a) evaluar la unión de los anticuerpos a VEGF humano y VEGF murino (Ver ejemplo 4).
- (b) Evaluar si un anticuerpo cuanta con capacidad para bloquear la unión del VEGF a los receptores VEGFR1 y VEGFR2 (Ver ejemplo 9)

Además, consideramos que no se está incluyendo como parte de la reivindicación 1 una amplia generalización de la invención pues al definirse específicamente los seis CDRs se están limitando las posibilidades de variación del anticuerpo, lo cual sumado a que las secuencias sustancialmente homólogas corresponden a secuencias que contienen 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de CDR dada, deriva en la inclusión de materia que corresponde a una justa generalización de las enseñanzas de la descripción.

Para hacer más evidente la necesidad del lenguaje empleado, nos permitimos remitir al señor Examinador a la descripción, en donde se establece lo siguiente (Ver sección C7: Equivalentes Biológicamente Funcionales),

"Como se describe en la presente (Sección C7), con la provisión de información estructural y funcional para una molécula biológica, se puede generar una variedad de moléculas equivalentes, o aún mejoradas. Esto aplica a los anticuerpos humanos anti-VEGF bloqueadores de VEGFR2 de la presente invención, como se ejemplifica por el anticuerpo r84. Aunque se deben conservar las propiedades de unión a antígeno y otras funcionales de un anticuerpo, existe un grado extremadamente alto de conocimiento en la técnica al producir anticuerpos equivalentes y aún mejorados una vez que se ha provisto un anticuerpo de referencia. Esta habilidad técnica se puede aplicar, en vista de las secuencias y de la información proporcionada en la presente, a la producción de anticuerpos adicionales que tienen características iguales, mejoradas o de otro modo deseables.

Para anticuerpos equivalentes, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en las regiones menos variables de dominio constante o variable del anticuerpo sin pérdida apreciable de capacidad interactiva de unión.

Otros tipos de variantes son anticuerpos con propiedades biológicas mejoradas con relación al anticuerpo de origen del cual se generaron. Estas variantes, o compuestos de segunda generación, son típicamente variantes de sustitución que comprenden uno o más residuos sustituidos de región hipervariable de un anticuerpo de origen. Una manera conveniente para generar estas variantes de sustitución es maduración por afinidad usando visualización en fagos."

De esta manera, la sección C7 describe cómo las modificaciones en la estructura de un anticuerpo se pueden llevar a cabo conservando las características deseables del mismo, y así se brinda una guía relacionada con los tipos de sustituciones de aminoácidos requeridas para dicho propósito. En este sentido, dichos equivalentes biológicamente funcionales corresponden a secuencias sustancialmente homologas que pueden ser obtenidas mediante las enseñanzas de la descripción, y por tanto que hacen parte del alcance de la presente invención.

Así las cosas, el normalmente versado en la materia contaría con la base requerida para la modificación de las secuencias de los seis CDRs, la cual sumada al conocimiento básico de técnicas analíticas de rutina, permitiría que dicho versado identificara los residuos que contribuyen significativamente a la unión al antígeno, y de esta manera el mismo se encontraría en plena capacidad de obtener diversas secuencias sustancialmente homologas que exhiban las mismas propiedades funcionales ventajosas del anticuerpo r84.

En este orden de ideas, es claro que un competidor podría llevar a cabo lo que se denomina en patentes como "**design around**", en donde, dicho competidor podría claramente modificar algunos aminoácidos aun manteniendo la actividad del anticuerpo sin infringir el alcance del anticuerpo reivindicado en una eventual patente.

Ahora bien, con el ánimo de complementar la argumentación previamente expuesta, adjuntamos al presente memorial una referencia del arte previo (*Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(22): 9230-9235*), la cual establece a lo largo de su contenido cómo diversas pruebas, tal como la mutagénesis por escaneo de alanina, encuentran plena utilidad en la determinación de la importancia funcional de cada residuo del CDR en un anticuerpo (Página 9232: "*Functional Mapping of the Antigen-Combining site*"). Al respecto, es fundamental resaltar que al llevar a cabo **50 mutaciones** de reemplazo de alanina en los CDRs, se encontró que **18** de ellas (denominadas "null spots") **no** mostraron un efecto significativo sobre la afinidad del anticuerpo al antígeno, lo cual en definitiva corresponde a una proporción sustancialmente alta (18/50).

Así las cosas, la aplicación de una técnica rutinaria (bien conocida por el versado en la materia) permite la identificación de los residuos que contribuyen significativamente en la unión del anticuerpo al antígeno, lo cual deriva en el entendimiento de los residuos que deben ser conservados para la obtención de variantes funcionales. Por tanto, es claro que no todas las modificaciones sobre las secuencias de los CDRs derivan en la alteración de las propiedades funcionales de un anticuerpo, y en consecuencia, el versado en la materia cuenta con las herramientas requeridas para obtener anticuerpos con secuencias homologas que conserven las propiedades significativas de un anticuerpo de partida sin la necesidad de aplicar actividad inventiva.

Por tanto, consideramos que el lenguaje empleado como parte de la reivindicación 1 (y el pliego reivindicatorio en general) es necesario para la protección de la invención, toda vez

que al incluirse puntualmente las regiones determinantes de complementariedad que caracterizan al anticuerpo se está caracterizando debidamente el anticuerpo mediante su estructura, y adicionalmente se están incluyendo como parte del alcance de la invención las variantes que presentan las propiedades funcionales ventajosas que permiten dar solución al problema técnico.

En consecuencia, el nuevo pliego reivindicatorio se encuentra dirigido hacia un anticuerpo específico, denominado r84, y sus variantes sustancialmente homologas, que se caracteriza mediante su debida estructura (Ver reivindicaciones 1-14), y por tanto, cumple con los requerimientos solicitados por el señor Examinador. Así mismo, las reivindicaciones dependientes 15 a 18 definen un inmunoconjugado de dicho anticuerpo, la 19 a 24 definen una composición que comprende el anticuerpo o sus inmunoconjugados, la 25 a 32 definen una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 14, la reivindicación 33 define un kit relacionado con el anticuerpo o inmunoconjugado del mismo, y las reivindicaciones 34 a 36 definen métodos de producción del anticuerpo y métodos in vitro de detección.

De esta manera, solicitamos al señor Examinador aceptar el nuevo pliego reivindicatorio como claro y conciso.

Nivel inventivo

Teniendo en cuenta las modificaciones realizadas sobre el pliego reivindicatorio consideramos que ninguna de las referencias citadas por su Despacho (D1 y D2) afecta el nivel inventivo de la presente invención, de manera que procedemos a incluir los argumentos a favor del nivel inventivo del anticuerpo reivindicado.

La referencia **D1 (US 6524583)** centra sus enseñanzas en anticuerpos anti-VEGF que inhiben específicamente la unión del factor de crecimiento endotelial vascular a uno de sus dos receptores (VEGFR2), lo cual es completamente claro al realizar una lectura general de dicha referencia. De esta manera, al hacer una comparación estructural entre las divulgaciones de D1 y el pliego reivindicatorio de la presente solicitud, es claro que las secuencias de CDRs acá reveladas son sustancialmente diferentes de las del anticuerpo que hace parte de la referencia D1.

En este orden de ideas, D1 revela el anticuerpo específico denominado 2c3, el cual **no** se caracteriza por presentar la combinación de propiedades funcionales exhibidas por el anticuerpo de la presente invención, toda vez que **no cuenta con la capacidad dual de unirse a VEGF murino y humano.**

En este sentido, con el fin de resaltar dicha diferencia nos permitimos remitir al señor Examinador a la descripción de la presente solicitud, en donde, específicamente el **ejemplo 4** corresponde al debido sustento que demuestra que el anticuerpo r84 (presente invención) se une tanto a VEGF murino como a VEGF humano, mientras que el anticuerpo 2c3 (D1), solo cuenta con capacidad para unirse a VEGF humano. Así las cosas, el anticuerpo r84 presenta una ventaja funcional sobre el anticuerpo de D1, tal como se expone en la descripción, de la siguiente manera,

*"Los resultados descritos anteriormente, muestran que el anticuerpo r84/PGN311 completamente humano se une tanto a VEGF murino como a VEGF humano, en tanto que los anticuerpos 2C3 y Avastin nos e unen a VEGF murino. **Esto es una ventaja importante en términos de la capacidad de r84 para valorar por ejemplo actividad anti-tumoral tanto en modelos singeneicos de ratón, es decir, donde se administran células tumorales de ratón a ratones y en modelos de xenoinjerto, es decir, donde se administran células tumorales humanas a ratones.***

*Además, la capacidad para unirse tanto a VEGF de humano como de ratón como se muestra por r84/PGN311 pero no por los anticuerpos tal como 2C3 y Avastin, significa que **los resultados mostrados por r84 en los modelos de xenoinjerto de ratón son probablemente más representativos de la actividad de r84 en sujetos humanos, es decir, los resultados con r84 en modelos pre-clínicos de ratón probablemente van a ser un buen modelo para lo que se verá cuando el anticuerpo se ponga en pacientes.** La razón para esto es que los anticuerpos que sólo pueden unirse a VEGF humano (por ejemplo, Avastin y 2C3) se unirán a VEGF producido por las células tumorales humanas pero no serán capaces de unirse a VEGF murino endógeno. Por supuesto, esto es diferente de la situación en un paciente humano, en el cual se presentarán el VEGF producido por el tumor y el VEGF endógeno.*

En contraste, si se está trabajando con un anticuerpo que se una tanto a VEGF humano como de ratón, entonces esto se unirá a todas las formas de VEGF presentes en el sistema de modelo de ratón y es probable que sea mucho más representativo de la situación cuando el anticuerpo se ponga en humanos. Ésta es una ventaja importante y una que se presenta por los anticuerpos de la invención.”

Por otra parte, el **ejemplo 9** contenido en la descripción demuestra que el anticuerpo r84 cuenta con la capacidad para bloquear la interacción entre VEGF y el receptor VEGFR2, sin afectar de manera sustancial la interacción de VEGF con VEGFR1, estableciendo particularmente que el anticuerpo de la presente invención presenta un bloqueo diferencial que es sustancialmente más alto que el exhibido por el anticuerpo 2C3 de D1. Lo anterior se constituye como una ventaja adicional de la presente invención sobre la referencia D1 (Ver ejemplo 9, e imágenes 8A y 8B).

Así las cosas, la invención acá reivindicada presenta una ventaja clara sobre D1, la cual permite su diferenciación, y adicionalmente le confiere nivel inventivo a la presente invención, pues no existe ninguna sugerencia en D1 para el desarrollo del anticuerpo r89, y por tanto, D1 es silencioso frente a un anticuerpos que presente las siguientes ventajas:

- (i) Utilidad en la evaluación de la actividad anti-tumoral en modelos singeneicos y en modelos de xenoinjerto,
- (ii) Obtención de resultados estadísticamente más representativos en los modelos de xenoinjerto de ratón, y
- (iii) Bloqueo diferencial de los receptores de VEGF más marcado, es decir, el bloqueo de la interacción de VEGF con VEGFR2 sin bloqueo sustancial de la interacción de VEGF con VEGFR1 es mayor para el anticuerpo de la presente invención en comparación con el exhibido por el anticuerpo 2c3 revelado por D1.

En cuanto a la referencia **D2 (WO 2003/102157)** notamos que la misma centra sus enseñanzas en el anticuerpo V1, el cual difiere estructuralmente del anticuerpo r84. Así las cosas, de acuerdo con el señor Examinador, D2 hace referencia a un anticuerpo anti-VEGF que se une selectivamente a VEGFR2 y bloquea VEGF, teniendo que cuenta que dicho anticuerpo cuenta con capacidad para unirse a VEGF humano.

En este sentido, no existe una enseñanza, o una sugerencia, que permita al versado en la materia saber que el anticuerpo V1 presenta la combinación de propiedades ventajosas exhibidas por el anticuerpo r84, y por tanto, D2 es silencioso frente a las ventajas del anticuerpo acá reivindicado.

Ahora bien, notamos que el señor Examinador afirmó lo siguiente,

"La diferencia entre la materia reclamada en la solicitud y el documento D1 (o D2) está dada por las secuencias con las cuales definen los tres CDRs de cadena ligera"

"El problema planteado por la solicitud es suministrar un anticuerpo alternativo que se une únicamente a VEGFR2 con mayor afinidad"

Asumimos que el señor Examinador hace referencia a "un anticuerpo que inhiba únicamente la unión de VEGF a VEGFR2 con mayor afinidad". Al respecto, nos permitimos mostrar nuestro desacuerdo, toda vez que el problema planteado por la presente invención corresponde a **proporcionar anticuerpos anti-VEGF con propiedades mejoradas.**

Por tanto, a partir de las ventajas previamente expuestas sobre las enseñanzas del arte previo (D1 y D2), es claro que el problema técnico planteado se soluciona satisfactoriamente a partir de la presente invención, toda vez que ninguna de las referencias en mención proporciona una guía para el desarrollo de anticuerpos anti-VEGF que cuentan con la ventaja de unirse tanto a VEGF murino como a VEGF humano, e inhibir significativamente la unión de VEGF al receptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) sin inhibir significativamente la unión de VEGF al receptor VEGFR1 (Flt-1).

De esta manera, consideramos que:

- (i) Las secuencias de CDRs divulgadas por las referencias D1 y D2 difieren sustancialmente de las secuencias enseñadas por la presente invención (anticuerpo r84, y sus variantes), y por tanto, tomando como punto de partida dichas secuencias **no** existe motivación alguna (en términos estructurales) para el desarrollo del anticuerpo acá reivindicado: SEQ ID Nos: 8, 9, 10, 5, 6 y 7. Por tanto, no existe obviedad alguna en el desarrollo de la presente invención,

ya que el anticuerpo r84 no era predecible a partir de las enseñanzas de D1 y D2.

- (ii) Las referencias D1 y D2 no divulgan anticuerpos anti-VEGF que cuenten con la capacidad de unirse a VEGF murino y a VEGF humano, e inhiban significativamente la unión de VEGF al receptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) sin inhibir significativamente la unión de VEGF al receptor VEGFR1 (Flt-1), y por tanto, las mismas no brindan ninguna motivación para el desarrollo de un anticuerpo como el que hace parte de la presente invención.
- (iii) Debido a lo anterior, la presente invención se constituye como una ventaja sobre el arte previo al proporcionar anticuerpos anti-VEGF mejorados que cuentan con propiedades funcionales ventajosas sobre las conocidas en el arte previo.

En consecuencia, el anticuerpo reivindicado, y las variantes del mismo, permiten dar solución a la necesidad de anticuerpos anti-VEGF mejorados, lo cual, tal como se expuso inicialmente, se encuentra debidamente sustentado en la descripción tanto para el anticuerpo r84 como para las secuencias sustancialmente homólogas del mismo, ya que se exponen todas las herramientas requeridas para que el versado en la materia lleve a cabo la invención.

Así las cosas, al tener en cuenta que ninguna referencia del arte previo enseña, ni sugiere, las seis secuencias de CDRs, ni las propiedades técnicas ventajosas que caracterizan a la presente invención, nos permitimos concluir que el desarrollo de la misma requirió de la aplicación de un arduo esfuerzo intelectual, y por tanto, cumple a cabalidad con el requisito de nivel inventivo.

Finalmente, solicitamos al señor examinador emitir una segunda acción oficial o la realización de una entrevista si a su juicio persisten objeciones en vista del nuevo pliego reivindicatorio.

En vista de lo anteriormente expuesto, respetuosamente solicitamos el retiro de las objeciones de la presente solicitud y la concesión del privilegio solicitado, ya que en opinión del solicitante cumple con todos los requisitos establecidos en la decisión 486.

Del Señor Director



JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.S.J.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

Calle 70 A No. 4 - 41

11393713

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0020255

Bogotá D.C., Febrero 28 de 2013 - 08:38:12

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426513441	27/02/2013	35.651.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
4 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	120.000.00
			\$120.000.00
			=====

SON: **CIENTO VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

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

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

, Febrero 28 de 2013 - 08:38:24

113937 14

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 13 - 0031002	
				Bogotá D.C., Abril 03 de 2013 - 12:11:18	
RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.				NI 860.047.372	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426513194	03/04/2013	48.633.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
22 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC		30.000.00	660.000.00
					\$660.000.00
=====					
SON: **SEISCIENTOS SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: 					

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
, Abril 3 de 2013 - 12:11:37					

113937

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 26,241
FECHA : ABRIL 7 DE 2010

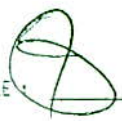
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80662256	07/04/2010	67,384,800.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1,300,000.00
	TOTAL :	\$ 1,300,000.00

SON: UN MILLON TRESCIENTOS PESOS

RESPONSABLE: 

BRIGARD & CASTRO Excedente de Palabras



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

AS: 113.937		PETITORIO	
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 10-067350- -00000-0000 Fecha: 2010-06-03 16:39:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Evs: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 523	
FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL			
1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE	Nombre: PEREGRINE PHARMACEUTICALS, INC. y AFFITECH RESEARCH AS Dirección: Franklin Avenue Suite 100 Tustin, CA 92780, US y Oslo Research Park, Gaustadelleen 21, N-0349 Oslo, Noruega. Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y Noruega Lugar de Constitución: Estados Unidos de América y Noruega Teléfono: Fax: E-mail		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual Número
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Calle 70A #4 – 41, Bogotá, Colombia. Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200 E-mail:		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual Número <u>80.410.337</u> TP <u>57492</u>
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sirvase indicar el numero de radicación (del poder).			
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Anita KAVLIE, Kyle SCHLUNEGGER. Dirección: Stromsborgveien 39H, N-0287 Oslo, Noruega; 27912 Perales, Mission Viejo, CA 92692, United States of America (respectivamente). Nacionalidad o Domicilio: Noruega y Estados Unidos de América (respectivamente).		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/GB2008/003745</u> Fecha <u>07.11.2008</u> Publicación Internacional No <u>WO 2009/060198 A1</u> Fecha <u>14.05.2009</u>			
6 Título (54): <u>COMPOSICIONES DE ANTICUERPO ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR Y MÉTODOS</u>			
7 Clasificación Internacional (51):			
8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	US	09.11.2007	60/987,015
	US	16.10.2008	61/106,047
	US	24.10.2008	61/108,023
9 Comprobante de pago No. <u>10-26.241; 10-29.174</u> Fecha <u>01-06-2010</u>			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.			

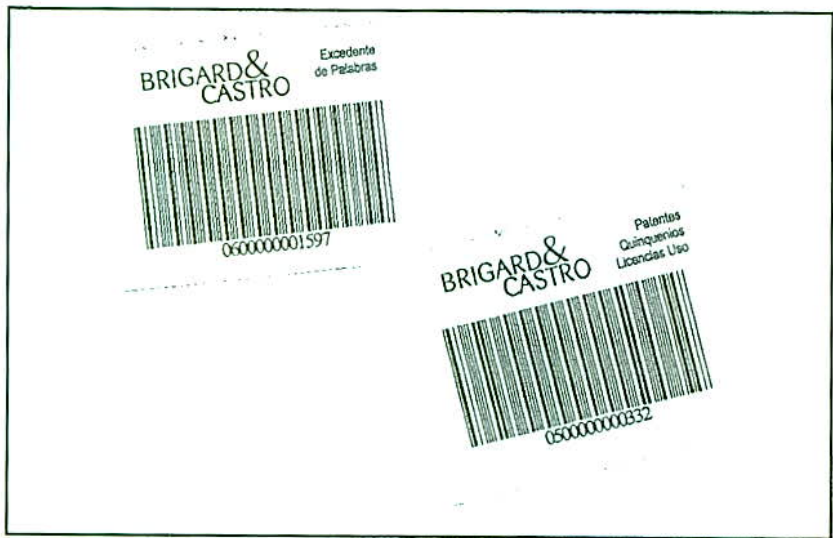
Ver siguiente página

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 554.000
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☐ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada.**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. **Fotocopia autenticada.**
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: **Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales. \$ 1'300.000 (50*\$26.000)**

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA: C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.



Calle 70 A No. 4 - 41
BOGOTÁ - COLOMBIA
TEL: (571) 744 22 00
FAX: (571) 742 22 00
www.bc.com.co

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-067350-00007-0000

Fecha: 2011-12-19 16:28:28 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 376 FASENACIONALI
Act. 449 RESPUESOPOSICI Folios: 3

As. 113937

Señor

DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E.

S.

D.

REF: Expediente No. 10 - 67350 solicitud de patente de invención a favor de
PEREGRINE PHARMACEUTICALS, INC. y AFFITECH RESEARCH AS.
Título COMPOSICIONES DE ANTICUERPO ANTI-FACTOR DE
CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR Y MÉTODOS.

RESPUESTA A OPOSICIÓN

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta a la oposición presentada por TITO NOÉ PARRA MURILLO en calidad de apoderado de la sociedad LABORATORIO FRANCO COLOMBIANO S.A. LAFRANCOL S.A. relacionada con la patentabilidad de la presente invención y notificada por fijación en lista el 23 de Septiembre de 2011.

Con el ánimo de responder a la oposición mencionada, me permito presentar los siguientes argumentos a favor de la patentabilidad de la presente invención.

El opositor ha afirmado que

"composiciones y combinaciones farmacéuticas que se refieren a anticuerpos humanos que inhiben de manera específica la unión de VEGF a solo uno (VEGFR2) de los dos receptores primarios, los cuales inhiben de manera efectiva la angiogénesis e inducen regresión tumoral, son prácticas y eventos totalmente conocidos en la industria farmacéutica carecen de novedad y nivel inventivo" (Subrayado fuera de texto)

Con respecto a la anterior afirmación, deseamos puntualizar que los anticuerpos reivindicados corresponden a la categoría de productos y no a "prácticas o eventos" tal como lo afirma el opositor en su escrito de oposición. Además, el opositor dice que las composiciones y combinaciones de anticuerpos son conocidos en la industria farmacéutica pero no hace referencia a documentos, publicaciones o artículos en concreto que revelen el anticuerpo reivindicado.

Como queda claro a partir del pliego reivindicatorio, la presente invención está dirigida a un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF) que comprende regiones variables de cadena pesada 3VH CDR y 3VL CDR en donde la región variable 3 VL CDR se encuentra caracterizada por las secuencias de aminoácidos descritas en la reivindicación 1.

Teniendo en cuenta el alcance de la reivindicación 1 y dependientes, es claro que ninguno de los documentos citados por el opositor se refiere a un anticuerpo con dichas características. De hecho, el opositor no se refiere en ningún momento a un anticuerpo anti-VEGF o por lo menos no ha citado ningún documento específico que revele todas y cada una de las características del anticuerpo reivindicado. Cabe resaltar que una invención se ve afectada por novedad, cuando el estado de la técnica revela todas y cada una de las características de la invención definidas en sus reivindicaciones independientes. Claramente el opositor ha fallado en revelar el estado de la técnica que pudiera afectar la solicitud en este sentido. Por lo tanto, la novedad de la invención no se ve afectada en ningún momento ni bajo ninguna circunstancia.

El opositor afirma además que *"dicha solicitud presenta prácticas comunes dentro del sector farmacéutico tanto en Colombia como en muchos otros países"*.

Con respecto a la anterior afirmación, los solicitantes de la presente invención no conocen ningún anticuerpo terapéutico aprobado para el mercado farmacéutico que inhiba específicamente la unión con VEGFR2.

Con respecto al nivel inventivo, deseamos resaltar que al no haberse demostrado la falta de novedad del anticuerpo reivindicado por parte del opositor, mucho menos lo es la falta de nivel inventivo. El hecho de que el opositor no haya citado documentos específicos del estado de la técnica en contra de las reivindicaciones independientes de la presente solicitud, no vemos como se pueda ver afectado el nivel inventivo de la misma.

Por otra parte, el opositor hace referencia a varios agentes activos que se conocen en el estado de la técnica (Paclitaxel, Cisplatino, Gemcitabina, Doxorubicina y Docetaxel) y cita documentos relacionados con dichos agentes.

Con respecto a lo anterior, deseamos puntualizar que estos agentes se encuentran listados en la parte (b) de la reivindicación 17 la cual es una reivindicación dependiente. Dicha reivindicación depende de la reivindicación 15 que a su vez depende de las reivindicaciones 1 – 14 las cuales caracterizan o definen el anticuerpo reivindicado en la reivindicación 1. Sobre este punto resaltamos que las reivindicaciones dependientes definen modalidades preferidas de la invención ya sea caracterizando o definiendo características particulares de los elementos descritos en las reivindicaciones independientes.

En este orden de ideas, la reivindicación 17 es una modalidad preferida del anticuerpo de la reivindicación 1 el cual se une a otro tipo de compuestos y al ser esta dependiente de la reivindicación 1 contiene todas y cada una de las características del anticuerpo definido en dicha reivindicación. Por lo tanto, teniendo en cuenta que los compuestos citados por el opositor no hacen referencia en ningún momento al anticuerpo reivindicado consideramos que la presente invención cumple con los requisitos de novedad y nivel inventivo.

Continúa argumentando el opositor que los puntos 16, 17, 18, 19, 20 y 21 pretender reivindicar métodos de tratamiento y de diagnóstico. En cuanto a esta afirmación, creemos que los puntos se refieren a reivindicaciones. Sin embargo, hacemos notar que las reivindicaciones 16-21 se refieren a un anticuerpo y a un inmunoconjugado y no a métodos de tratamiento.

De acuerdo a los argumentos citados anteriormente, respetuosamente solicito al señor examinador declarar la presente oposición como infundada debido a que los fundamentos que presenta el opositor no desvirtúan la patentabilidad de la presente solicitud.

Del Señor Director


JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.S.J.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

Calle 70 A No. 4 - 41

Broadly neutralizing anti-hepatitis B virus antibody reveals a complementarity determining region H3 lid-opening mechanism

Seung-Wook Chi^{*†}, Cheol-Young Maeng[‡], Seung Jun Kim^{*§}, Mee Sook Oh[‡], Chun Jeih Ryu^{*¶}, Sang Jick Kim[‡], Kyou-Hoon Han[‡], Hyo Jeong Hong[‡], and Seong Eon Ryu^{*§}

^{*}Center for Cellular Switch Protein Structure, [†]Molecular Cancer Research Center, [‡]Therapeutic Antibody Research Center, and [§]Systemic Proteomics Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

Edited by Rino Rappuoli, Novartis Vaccines, Siena, Italy, and approved April 8, 2007 (received for review February 14, 2007)

The humanized monoclonal antibody HzKR127 recognizes the preS1 domain of the human hepatitis B virus surface proteins with a broadly neutralizing activity *in vivo*. We present the crystal structures of HzKR127 Fab and its complex with a major epitope peptide. In the complex structure, the bound peptide forms a type IV β -turn followed by 3₁₀ helical turn, the looped-out conformation of which provides a structural basis for broad neutralization. Upon peptide binding, the antibody undergoes a dramatic complementarity determining region H3 lid opening. To understand the structural implication of the virus neutralization, we carried out comprehensive alanine-scanning mutagenesis of all complementarity determining region residues in HzKR127 Fab. The functional mapping of the antigen-combining site demonstrates the specific roles of major binding determinants in antigen binding, contributing to the rational design for maximal humanization and affinity maturation of the antibody.

alanine-scanning mutagenesis | crystal structure | humanized antibody | virus neutralization

Human hepatitis B virus (HBV) is a small enveloped DNA virus that causes acute and chronic hepatitis in humans (1–3). There are approximately 400 million carriers of HBV worldwide, posing a serious health threat. The current HBV vaccines have several limitations, including nonresponsiveness, escape mutants, and low immunogenicity (4). Recently, the potential of immunoprophylaxis for virus prevention has been increased by the discovery of monoclonal antibodies that have broad specificity toward various isolates of infectious viruses (5, 6).

The HBV envelope consists of three surface glycoproteins called the large (L), middle (M), and small (S) proteins. All of these proteins are translated from a single ORF comprising preS1, preS2, and S domains (7). Translation of S, preS2+S, and preS1+preS2+S domains results in S, M, and L proteins, respectively (Fig. 1). The L protein, preferentially localized in infectious HBV particles, plays an essential role in viral infection (7, 8), and its preS1 domain is responsible for cell attachment in viral infection (9–12). In particular, the residue 21–47 region of preS1 has been suggested to contain a specific binding site for hepatocyte receptors and also has been shown to carry virus-neutralizing epitopes (10–13).

In the blood of HBV-infected persons, the noninfectious subviral particles with M and S proteins are present in excess amounts over the infectious virus particles containing L protein (7, 8). Thus, neutralizing anti-preS1 antibodies are thought to have advantages over the neutralizing antibodies targeting S protein, which are currently undergoing clinical trials (4). Previously, we generated an anti-preS1 murine antibody KR127 that recognizes *adr* subtype preS1 (residues 37–45) (15). KR127 and the humanized version of KR127 antibody (HzKR127) bind to the preS1 domain of various clinical HBV isolates, including both *adr* and *ayw* subtypes, suggesting their broad neutralizing activity (15, 16). HzKR127 also has been shown to exhibit *in vivo*

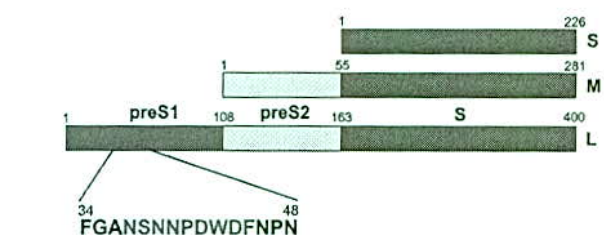


Fig. 1. Domains of HBV surface proteins. The domain structures of S, M, and L proteins are presented with each domain colored differently. The *adr* subtype preS1 includes an epitope that is recognized by the neutralizing monoclonal antibody HzKR127. The peptide sequence of the epitope region is presented below the preS1 domain, with the epitope colored red.

neutralizing activity in chimpanzee and to protect the chimpanzee from HBV infection (16), indicating the high potential of the antibody for the immunoprophylaxis of HBV infection and therapy of hepatitis.

An understanding of how the broadly neutralizing antibodies recognize antigens would facilitate design of vaccines by providing information regarding essential antigenic features. In particular, the antigen–antibody complex structure could provide direct information about the native antigen structure. The structural information could lead to the design of structurally constrained peptide antigens for the development of efficient vaccines (17). In HIV-1, the broadly neutralizing antibody b12 binds to the conformationally invariant and functionally conserved CD4-binding site on gp120 (18, 19). The extensive interaction of b12 complementarity determining region (CDR) heavy-chain loops with the CD4-binding loop of gp120 contribute to the high-affinity binding that is required for the effective neutralization of primary HIV-1 isolates (19). The long CDR H3

Author contributions: S.-W.C. and C.-Y.M. contributed equally to this work; H.J.H. designed research; S.-W.C., C.-Y.M., Seung Jun Kim, M.S.O., C.J.R., Sang Jick Kim, and S.E.R. performed research; K.-H.H. and H.J.H. contributed new reagents/analytic tools; S.-W.C., C.-Y.M., Seung Jun Kim, M.S.O., C.J.R., Sang Jick Kim, K.-H.H., H.J.H., and S.E.R. analyzed data; and S.-W.C., H.J.H., and S.E.R. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Abbreviations: CDR, complementarity determining region; HBV, hepatitis B virus; HzKR127, humanized KR127.

Data deposition: The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org [PDB ID codes 2EH7 (free HzKR127 Fab) and 2EH8 (complexed HzKR127 Fab)].

[†]Present address: Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University, Seoul 143-747, Korea.

[¶]To whom correspondence may be addressed. E-mail: ryuse@kribb.re.kr or hjhong@kribb.re.kr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0701279104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

Table 1. Crystallographic and refinement statistics

Data set	Fab	Fab/epitope complex
Space group	C2	C2
Cell constant		
<i>a</i> , Å	100.12	95.34
<i>b</i> , Å	61.11	61.27
<i>c</i> , Å	77.53	83.54
β , °	91.49	93.25
Resolution, Å	2.50 (2.64–2.50)	2.60 (2.74–2.60)
Total observation	44,196 (6,424)	52,874 (7,721)
Unique reflections	15,758 (2,343)	14,611 (2,070)
Completeness, %	96.3 (97.9)	97.5 (96.1)
<i>R</i> _{merge} [†] , %	7.8 (29.4)	7.5 (28.0)
Multiplicity	2.8 (2.7)	3.6 (3.7)
Average <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	5.9 (2.4)	6.8 (2.1)
<i>R</i> _{cryst} [‡]	20.7 (31.7)	19.3 (30.8)
<i>R</i> _{free} [§]	25.2 (38.0)	25.8 (40.7)
rmsd bond lengths, Å	0.006	0.006
rmsd bond angles, °	1.320	1.348

Values in parentheses are for the highest resolution bin.
[†]*R*_{merge} = $\sum_i |I_i - \langle I \rangle| / \sum_i I_i$, where *I* is the intensity for the *i*th measurement of an equivalent reflection with the indices *h*, *k*, *l*.
[‡]*R*_{cryst} = $\sum |F_o - F_c| / \sum F_o$, where *F*_o and *F*_c are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively.
[§]The *R*_{free} value was calculated from 5% of all data that were not used in the refinement.

of another HIV-1-neutralizing antibody, 4E10, has been proposed to contact the viral membrane, which results in effective neutralization (20).
 To shed light on the antigen recognition mechanism of the broadly neutralizing antibody of HBV, we determined the crystal structures of antibody HzKR127 in its free and antigen peptide-bound forms. The looped-out conformation of the bound peptide provides a structural basis for broad specificity of the antibody against various clinical HBV isolates. Structural comparison between the free and bound forms reveals a mechanism of lid opening in antibody–antigen recognition. To assess their relative importance for antigen binding, we performed extensive alanine-replacement scan of all CDR residues in HzKR127. The mapping of the functional paratope of HzKR127 would contribute to the generation of improved anti-preS1 humanized antibodies.

Results

Structure Determination and Overall Structure. The crystal structures of HzKR127 Fab in its free and preS1 peptide-bound forms were determined by the molecular replacement method and refined to 2.5- and 2.6-Å resolutions, respectively (Table 1). In the Fab–peptide complex structure, the clearly defined density was observed for the bound peptide (residues 36–45, 1P–10P) [supporting information (SI) Fig. 5A]. The HzKR127 Fab has the canonical β sandwich Ig fold with four domains: V_L, C_L, V_H, and C_H1 (where L indicates light chain; H, heavy chain; V, variable domain; C, constant domain). The elbow angle of the HzKR127 Fab is 153° that falls within the range of 127 to 225° commonly observed for Fab molecules. The CDRs L1, L2, and L3 conform to the canonical conformations belonging to the classifications κ L1-3, L2-1, and κ L3-1 (21), respectively. The CDRs H1 and H2 belong to canonical classes H1-1 and H2-2 (21), respectively. The short CDR H3 (six residues in length) is folded inside the antigen-binding site that exhibits a large conformational change upon the peptide binding (see below).

The structures of constant domains (C_L and C_H1) are almost the same for both the free and peptide-bound Fabs. The peptide binds to the interface between the light- and heavy-chain variable domains (V_L and V_H) with the intermolecular interface of 697 Å² (SI Fig. 5B). The bound peptide is surrounded by light-chain CDRs L1–L3 and heavy-chain CDRs H1–H3 (SI Fig. 5B). The L3 and H3 loops have the closest contacts with the preS1 peptide, providing the most significant contributions to the peptide binding. The L1, H1, and H2 loops form a few interactions with the peptide. The H2 loop is situated distal to the binding pocket behind the H1 loop, maintaining the configuration of the H1 loop adequate for preS1 peptide binding. On the other hand, the L2 loop has no direct interaction with the preS1 peptide.

Peptide Conformation. The preS1 peptide comprises a sequence of Ala–Asn–Ser–Asn–Asn–Pro–Asp–Trp–Asp–Phe–Asn (1P–11P, residues 36–46 in the preS1 sequence). In the complex structure, the bound preS1 peptide exhibits two consecutive turns (Fig. 2A). Secondary structure analysis by the program PROMOTIF (22) indicated that residues 2P–5P of the bound peptide form a type IV β turn followed by a 3_{10} helical turn (residues 5P–9P). In the type IV β turn, main-chain ϕ and ψ angles are −105.3°, −14.3° and −73.1°, −31.4° for the *i* + 1 (Ser3P) and *i* + 2 (Asn4P) residues, respectively. The running direction of the backbone is kinked around Asn5P. A total of seven intrapeptide

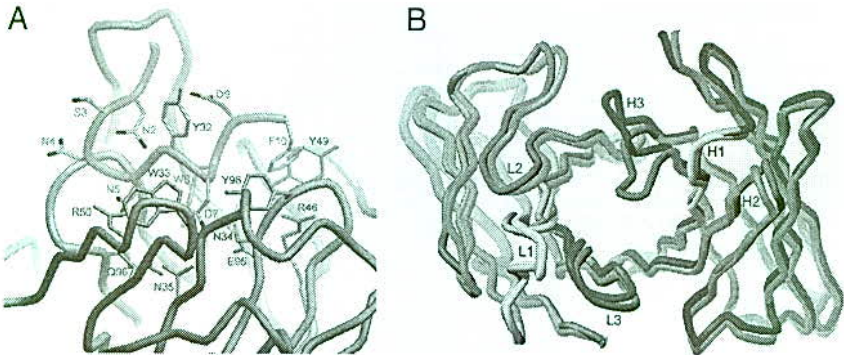


Fig. 2. Crystal structure of the HzKR127 Fab–preS1 peptide complex. (A) Conformation of the preS1 peptide bound to HzKR127 Fab. Note that the side chains of Ser3P and Asn4P point toward the outside of the binding pocket. The side chains of the Fab residues involved in major interactions with the peptide are drawn and labeled. The light, heavy, and peptide chains are shown in red, blue, and green, respectively. (B) H3 lid opening. The free and bound structures of HzKR127 Fab are superimposed. The backbone structure of the variable domains in the Fab is drawn as thick tubes, and the light and heavy chains are colored pink and blue, respectively. The free and bound forms are shown in lighter and darker colors, respectively. The CDR1, CDR2, and CDR3 loops are colored yellow, green, and red, respectively.

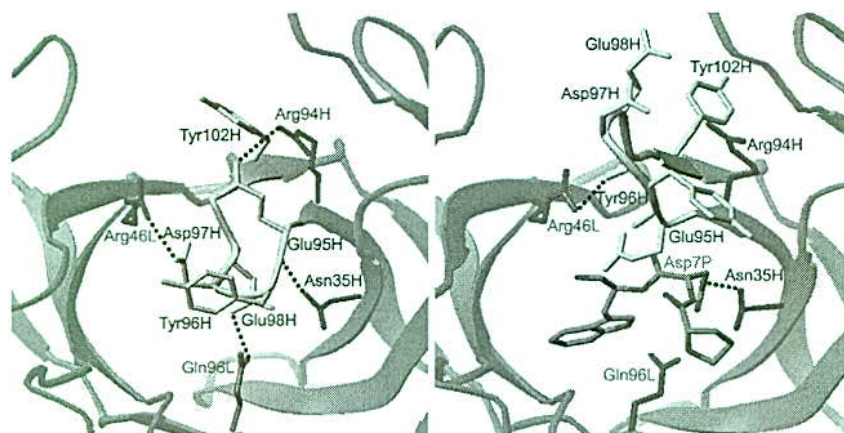


Fig. 3. Comparison of antigen-binding site in the free and bound HzKR127 Fabs. Interactions between the H3 lid (yellow) and neighbors in the free (Left) and bound (Right) HzKR127 Fabs. The residues involved in the interactions are drawn, and the major interactions are presented as dotted lines. The light and heavy chains are colored pink and blue (labeled red and blue), respectively. The bound peptide residues Pro6P–Trp8P are presented as sticks with atomic colors.

hydrogen bonds stabilize the double-turn conformation. The first turn involves four hydrogen bonds between the side-chain atoms (OD1 and ND2) of Asn2P and the main-chain atoms of Asn4P and Asn5P (SI Table 3). The second turn is maintained by three hydrogen bonds formed between the backbone carbonyl oxygen atoms of Asn5P and Pro6P and the backbone amide nitrogen atoms of Trp8P and Asp9P. The first turn of the peptide is situated proximal to the L3 loop, whereas its second turn has the closest contact with the H3 loop (SI Fig. 5B).

Alanine-scanning mutagenesis of residues 2P–10P of the preS1 epitope showed that mutations in residues 2P and 5P–10P caused a significant decrease in antibody binding, whereas mutations in Ser3P and Asp4P did not have any effect (16). In particular, mutations at Asp7P and Trp8P completely impaired the antibody binding (16). In the complex structure, the residues 5P–10P were placed in the binding pocket of the Fab with Asp7P and Trp8P, located deep inside the pocket (Fig. 2A), explaining their mutational effects. In contrast, the side chains of Ser3P and Asn4P point toward the outside of the binding pocket (Fig. 2A), consistent with no mutational effect of Ser3P and Asp4P on antibody binding.

Conformational Changes upon Peptide Binding. The superposition of the free and complexed Fab structures reveals conformational changes triggered by the preS1 peptide binding (Fig. 2B). The most noticeable conformational change between the free and complexed structures occurs at the H3 loop (Fig. 2B). The residues Glu95H–Tyr102H of the H3 loop are found to adopt entirely different conformation between the two forms (Fig. 3). The largest atomic displacement in the main chain occurs in Asp97H having a 9.6 Å difference between the two structures. Tyr96H and Glu98H show deviations of 7.7 and 8.0 Å in the main chain, respectively. The side-chain orientation also differs substantially in the free and complexed forms. The side chain of Glu98H rotates from one side of the H3 loop to the other side, showing the largest movement at 15.1 Å. The aromatic side chains of Tyr96H and Tyr102H also flip to the opposite direction, with 7.3 and 6.5 Å shifts, respectively.

The CDR H3 lid opening significantly changed the shape of the antigen-binding site. In the free form, no prominent binding groove was present on the surface of the antigen-binding site. The distinct groove connected to a deep binding pocket of HzKR127 became fully exposed only by the CDR H3 lid opening. The prominent groove, with a length of 14 Å, width of 11 Å, and depth of 10 Å, was capable of accommodating the two turns of the bound peptide. The most striking change in the

shape of the binding site was the creation of a binding pocket for Trp8P, where the aromatic ring of Trp8P snugly fit into the deep pocket, leading to tight locking-in of the peptide.

The CDR H3 lid opening also resulted in a considerable reconstitution of hydrogen bond network around the antigen-binding site (Fig. 3). In the free structure, the overall H3 loop conformation was maintained by hydrogen bonds between the H3 loop and the rest of the Fab. Upon the preS1 peptide binding, most of these hydrogen bonds were disrupted and a new network of interactions was formed.

Functional Mapping of the Antigen-Combining Site. To evaluate the relative importance of individual CDR residues in antigen binding, we performed alanine-scanning mutagenesis of all of the residues in the CDRs of HzKR127 Fab (SI Tables 4 and 5) and determined the affinity of each alanine-mutated antibody (SI Fig. 6). The ELISAs on the 50 alanine-replacement mutants, 21 from heavy chain and 29 from light chain, identified 16 hot spots, 7 warm spots, 18 null spots, and 2 affinity-enhanced spots. First, the 16 hot spots (Trp33H, Met34H, Asn35H in CDR H1, Arg50H in CDR H2, Glu95H, Tyr96H in CDR H3, Leu27bL, Ser27eL, Asn28L, Lys30L, Tyr32L, Asn34L in CDR L1, and Glu90L, Gly91L, Phe94L, Pro95L in CDR L3) completely lost the antigen-binding activity (>900-fold decrease in affinity) upon alanine mutation. Second, the 7 warm spots (Tyr52H, Pro52aH in CDR H2, Tyr-27 dl in CDR L1, Leu50L, Asp55L in CDR L2, and Val89L, Gln96L in CDR L3) showed the reduced affinity by >10-fold upon mutation. Third, the 18 null spots (Ser31H, Ser32H in CDR H1, Ile51H, Gly53H, Asp54H, Gly55H, Asp56H, Thr57H, Asn58H in CDR H2, Ser26L, Gln27L, Gly29L, Thr31L in CDR L1, Ser52L, Lys53L, Leu54L, Ser56L in CDR L2, and Thr97L in CDR L3) showed no significant effect on the affinity (<2-fold decrease or slight increase in affinity) upon mutation. Lastly, alanine mutations of Asp97H or both Asp97H and Tyr102H in CDR H3 resulted in significant (>10-fold) increase in affinity.

The mapping of the hot spots, warm spots, and affinity-enhanced spots onto the antigen-bound structure of HzKR127 Fab shows the overall distribution of major binding determinants (Fig. 4). The hot spots (colored pink in Fig. 4) mainly surround the binding groove, comprising the antigen-combining site, and thereby most of them involve direct contacts with the preS1 peptide. On the other hand, most warm spots (colored blue in Fig. 4) are situated more remote from the center of the binding site. The null spots are mainly distributed in the CDRs L1, L2, and H2, forming no direct interaction with the peptide. The

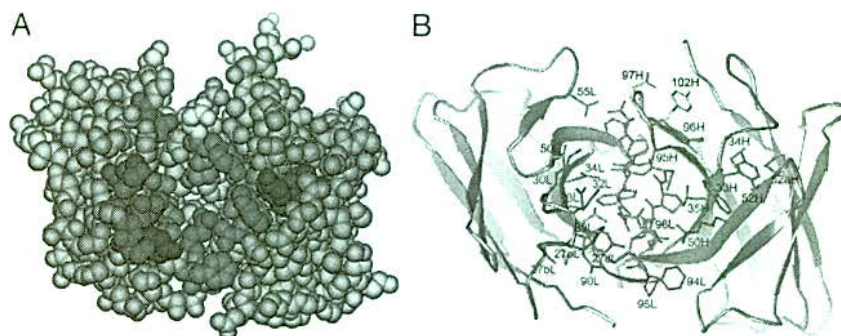


Fig. 4. Mapping of functionally important residues on the crystal structure of preS1 peptide-bound H2KR127 Fab. (A) Space-filling representation of the interface of the Fab. The variable domain in the Fab is shown in gray. The hot spots, warm spots, and affinity-enhanced spots are colored as follows: pink (>900-fold decreased affinity relative to WT; $\Delta\Delta G_D$, >4 kcal/mol), blue (10- to 900-fold decreased affinity; $\Delta\Delta G_D$, 1.4–4 kcal/mol), and yellow (>10-fold increased affinity; $\Delta\Delta G_D$, less than -1.4 kcal/mol). Tyr102H (labeled in 102H) is colored yellow because the double-alanine mutation of both Asp97H and Tyr102H increased the affinity by 25-fold. (B) Ribbon representation of the H2KR127 Fab bound to preS1 peptide. The color coding is the same as in A. The bound preS1 peptide is drawn as green sticks. Among the hot spots, Gly91L is not displayed because of the absence of its side chain.

presence of affinity-enhanced spots (colored yellow in Fig. 4) is restricted to CDR H3, and the spots are not involved in intimate contact with the peptide antigen.

The comparison of antigen-binding interaction profile of H2KR127 (Fig. 4A) with other antibodies reveals the distinct characteristics of H2KR127. First, H2KR127 has a very large number of hot spots (16) of $\Delta G_{\text{mutant}} - \Delta G_{\text{WT}}$ ($\Delta\Delta G_D$) of >4 kcal/mol, where ΔG indicates free energy change. Thus, formation of H2KR127–preS1 complex is stabilized by the accumulation of many interactions throughout the binding interface, as found in the A6–IFN- γ receptor complex (23) and the VEGF–Fab complex (24). This contrasts with the antibody D1.3–hen egg white lysozyme (HEL) complex (25) and the HyHEL-10–lysozyme complex (26), in which only a small subset of residues dominate the energetics of association (one and three hot spots of $\Delta\Delta G_D$ of >4 kcal/mol, respectively). Second, major binding determinants are concentrated in light-chain CDRs (10 of 16 hot spots) (Fig. 4B). The extensive involvement of light-chain CDRs in direct contacts with antigen is contrary to what has been observed for most other peptide–antibody complexes. Generally, the heavy-chain CDRs make more extensive contacts than light-chain CDRs (27). Thus, the H2KR127–preS1 complex is among the few examples that are exceptional to the general trend.

Elucidation of Specific Roles of Major Binding Determinants. On the basis of the functional mapping on the structure (Fig. 4B), we investigated specific roles of the 23 major binding determinants (16 hot spots and 7 warm spots). Among them, 12 major binding determinants are involved in direct contacts with the antigen (SI Table 3). Consistent with the structural features for the Fab–preS1 complex, alanine substitutions on most directly contacting residues completely abrogated (Trp33H, Asn35H, Arg50H, Glu95H, Tyr96H, Asn28L, Tyr32L, Asn34L, Gly91L, and Phe94L) or significantly impaired (Gln96L, 27-fold reduction; Val89L, 11-fold reduction) the antigen-binding activity (Table 2). Overall, most of the direct Fab–peptide interactions observed in the complex structure are critical for the Fab–peptide binding, exhibiting good correlation between the structure and antigen-binding activity.

The other 11 major binding determinants seem to play a scaffolding role by precisely positioning the contacting residues for optimal interaction with the antigen or by maintaining the CDR loops in a binding-competent configuration. Without direct contact with the antigen, the six scaffolding residues (Met34H, Leu27bL, Ser27eL, Lys30L, Gln90L, and Pro95L) exhibited complete loss of the binding activity, and the five

scaffolding residues (Tyr52H, Pro52aH, Tyr-27 dl, Leu50L, and Asp55L) showed 10- to 100-fold reductions in the affinity upon mutation (Table 2). For example, Gln90L stabilizes the canonical conformation of L3 loop by forming a hydrogen bond with the main-chain carbonyl group of Pro95L in CDR L3. In case of Tyr52H, the residue keeps, through hydrophobic interaction, the ring orientation of Trp33H in CDR H1 optimal for direct

Table 2. Summary of mutagenesis in H2KR127

Mutant	K_d , nM	$K_d\text{MUT}/K_d\text{WT}$
CDR H1		
W33A	>10,000	>900
M34A	>10,000	>900
N35A	>10,000	>900
CDR H2		
R50A	>10,000	>900
Y52A	276.80 $\pm$ 23.60	25.16
P52aA	170.30 $\pm$ 5.32	15.48
CDR H3		
E95A	>10,000	>900
Y96A	>10,000	>900
D97A	0.57 $\pm$ 0.03	0.05
D97A/Y102A	0.44 $\pm$ 0.10	0.04
CDR L1		
L27bA	>10,000	>900
Y27dA	1032.70 $\pm$ 56.10	93.90
S27eA	>10,000	>900
N28A	>10,000	>900
K30A	>10,000	>900
Y32A	>10,000	>900
N34A	>10,000	>900
CDR L2		
L50A	159.40 $\pm$ 21.37	14.50
D55A	225.20 $\pm$ 2.97	20.50
CDR L3		
V89A	121.20 $\pm$ 4.62	11.00
Q90A	>10,000	>900
G91A	>10,000	>900
F94A	>10,000	>900
P95A	>10,000	>900
Q96A	293.60 $\pm$ 7.13	26.70
WT	11.00 $\pm$ 1.66	

The dissociation equilibrium constants of H2KR127 mutants ($K_d\text{MUT}$) were measured by competitive indirect ELISA and compared with that of H2KR127 WT ($K_d\text{WT}$).

interaction with preS1 peptide (Fig. 4B). These observations illustrate the functional importance of the scaffolding role in antigen binding.

Discussion

The structures of the HzKR127 Fab and the preS1 peptide complex demonstrate how the antibody is very broadly neutralizing. The sequence of preS1 (residues 37–45) epitope is highly conserved among various different HBV isolates except residues 38 and 39 (15). On the complex structure, the side chains of all of the highly conserved preS1 residues are involved in direct contacts with the antibody. In comparison, the variable residues 38 and 39 point toward the outside of the binding pocket with few contacts with the antibody. This agrees well with the finding that the alanine substitutions on the positions do not affect the reactivity of the preS1 with HzKR127 (16).

So far, structural studies on broad neutralization mechanism of antiviral antibodies have focused mainly on anti-HIV antibodies. The complex structure of anti-HIV antibody 4E10 and its epitope showed why it is broadly neutralizing. The WFXI(T/S) motif of the epitope is highly conserved in all HIV-1 viruses, and variable residues near the epitope are situated on the opposite side of the helical epitope conformation with few contacts with the antibody (20). The ability of anti-HIV antibody 447-52D to bind many different gp120 V3 sequences stems from the mode of peptide-antibody recognition, where the peptide β hairpin forms a three-stranded mixed β sheet with CDR H3, with most of the V3 side chains exposed to solvent (28). Another broadly neutralizing anti-HIV antibody, b12, also interacts with the conserved CD4 epitope through extensive CDR heavy-chain contacts (18, 19). However, there is no information for the broad neutralizing mechanisms for HBV monoclonal antibodies. This study is the first case to uncover a structural basis for a broad neutralization mechanism of an anti-HBV antibody.

The three-dimensional structure of antigen-bound HzKR127 Fab and the comprehensive alanine-scanning mutagenesis of its antigen-combining site identified major binding determinants, including the most critical CDR residues in antigen-binding. Based on the significant structure-function correlation in antigen-combining site, we elucidated their specific roles for antigen binding. This knowledge is crucial for humanization of the antibody by specificity-determining residue grafting. The CDR-grafting, used for constructing HzKR127, is not enough for reducing the immunogenicity of a murine antibody to a minimum because murine CDRs could still elicit antiviral region responses (29, 30). Therefore, humanization of an antibody by grafting only specificity-determining residues onto a human antibody framework may further reduce the immunogenicity. In this process, the framework residues in contact with antigen (Arg46L and Tyr49L in FR2) and the scaffolding residues, which are hot spots but are not in contact with an antigen (Met34H, Leu27bL, Ser27eL, Lys30L, Gln90L, and Pro95L), should be retained.

Although HzKR127 neutralizes HBV *in vivo*, the humanized antibody of higher affinity would be more effective in clinical use. Structural inspection of affinity-enhanced spots offers a basis of rational design for further affinity maturation. It is noteworthy to find that alanine replacements of Asp97H or both Asp97H and Tyr102H (D97A/Y102A) increased the affinity by 20- and 25-fold, respectively (Table 2). How could the alanine mutations on Asp97H and Tyr102H increase the antigen-binding affinity? Both Asp97H and Tyr102H in CDR H3 are involved not in direct interaction with antigen but in the CDR H3 lid opening (Fig. 3). The Asp97H forms a salt bridge with Arg46L (FR2), which stabilizes the closing of the CDR H3 lid in the free structure (Fig. 3). Obviously, the mutation of Asp97H into alanine would disrupt the salt bridge seen in the structure, making the H3 loop more flexible. This may facilitate the

structural transition from closed to open state. On the other hand, Tyr102H is located at the base of the CDR H3 lid, and its aromatic ring flips in the opposite direction upon antigen binding (Fig. 3). The small side chain of alanine is likely to reduce the steric clashes of lid opening more than the bulky rigid aromatic ring of tyrosine. We can therefore conclude that the alanine mutations in both the positions may increase the affinity by facilitating the CDR H3 lid opening, suggesting that the antigen-binding affinity could be further enhanced by modulating the flexibility of the CDR H3 lid.

The three-dimensional structure of HBV surface protein, including preS1, has not yet been determined, and the peptide structure observed in this study may provide an insight into the native structure of preS1 domain. In the complex structure, despite the characteristic secondary structure of the peptide, all Ramachandran angles of the peptide main chain lay on the most favored and additionally allowed regions, and no residue lies in generously allowed or disallowed regions (data not shown). The stable main-chain conformation and the extensive intrapeptide hydrogen bonds (SI Table 3) suggest that the observed peptide conformation may have correlation with its native structure in the surface of HBV.

In summary, we determined the free and preS1 peptide-bound structures of HzKR127 Fab exhibiting *in vivo* HBV-neutralizing activity. The structures reveal a lid-opening mechanism for antigen-binding, illustrating one of the largest conformational changes in antigen-antibody recognition. In the complex structure, only the conserved peptide residues form tight interaction with the Fab, whereas the varied residues are looped out from the binding pocket, which enables the antibody to recognize various virus isolates. The information regarding the broad neutralizing mechanism and the antigen recognition should contribute to the design of vaccines and the development of immunoprophylaxis strategies against HBV. The extensive alanine-scanning mutagenesis of CDRs identified major binding determinants in antigen binding, offering a basis for maximal humanization of the antibody. Affinity-enhanced mutations in CDR H3 suggest the possibility to further enhance the antigen-binding affinity by modulating the process of CDR H3 lid opening.

Materials and Methods

Preparation of HzKR127 Fab Fragment. The cDNA encoding the V_H and C_H1 domains of HzKR127 was synthesized by PCR from humanized heavy-chain plasmid pHKR127HC (16) and cloned into the Sall–NotI sites of pRc/CMV (Invitrogen, Carlsbad, CA) to yield pCMV–HKR127–Fd. This plasmid and humanized light-chain plasmid pKC–dhfr–HKR127 (16) were cotransfected into dihydrofolate reductase-deficient CHO cell line (DG44) and stably transformed cell lines were selected, as previously described (16). The isolated cell line was adapted in nucleosides-minus MEM α medium (Gibco/BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% dialyzed FBS and 20 μ M methothrexate (Sigma, St. Louis, MO), then transferred to Cell Factories (Nunc, Roskilde, Denmark) containing CHO-S-SFM II (Gibco/BRL) and 20 μ M methothrexate. To purify the Fab, the culture supernatants were harvested, filtered through a 0.22- μ m filter, and loaded onto a preS1–Sepharose affinity column, in which GST–preS1 (residues 1–56) (15) was conjugated to CNBr-activated Sepharose FF (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ). The bound HzKR127 Fab fragments were eluted by the addition of 0.2 M glycine–HCl, pH 2.7, followed by immediate neutralization with 1 M Tris–HCl, pH 8.0. The HzKR127 Fab-containing fractions were pooled and dialyzed against 10 mM Hepes–NaOH, pH 7.4. The purity of pooled fraction was analyzed by SDS/PAGE, followed by silver staining, and stored at -70°C until use.

Crystallization and Diffraction Data Collection. All of the crystals of HzKR127 Fab were obtained at 18°C by the hanging drop vapor diffusion method. An aliquot (1.7 μ l) of the protein (20 mg/ml) was mixed with an equal volume of a reservoir solution containing 17% PEG 4000, 10 mM Hepes–NaOH (pH 7.5), and 0.2 M ammonium sulfate. Crystals appeared 4 days after the initial setup, and they belonged to the space group C2 with unit cell dimensions of $a = 100.12$ Å, $b = 61.11$ Å, $c = 77.53$ Å, and $\beta = 91.49^\circ$. For the crystallization of the complex, *adr* subtype HBV preS1 (residues 36–46) peptide (acetyl-ANSNNPDWDFN-amide) was used with a 10-fold molar excess of peptide over Fab. Crystals of the complex grew in the space group C2 with cell dimensions of $a = 95.34$ Å, $b = 61.27$ Å, $c = 83.54$ Å, and $\beta = 93.25^\circ$. X-ray diffraction data were collected at room temperature by using a RU-300 rotating anode generator (40 kV and 100 mA; Rigaku, Tokyo, Japan) equipped with an R-Axis IV++ detector (Rigaku) and an Osmic mirror (Osmic, Troy, MI). Data for phasing and refinement were processed with the programs MOSFLM (31) and CrystalClear (Rigaku).

Structure Determination and Refinement. The structures of free HzKR127 Fab and the Fab–peptide complex were determined by molecular replacement by using the program AMoRe (32). For the structure determination of free Fab, the anti-hapten (5-*para*-nitrophenyl phosphonate-pentanoic acid) 48G7 Fab (PDB ID code 1AJ7) that showed the highest sequence homology with HzKR127 Fab was used as the search model. The structure of the Fab–peptide complex was determined by using the refined free form structure as the starting model. The programs O (33) and CNS (34) were used in the model building and refinement, respectively. During the refinement, the randomly selected 5% of data were set aside for the R_{free} calculation. The free structure of 2.5 Å resolution was refined to an R_{cryst} of 20.7% and an R_{free} of 25.2%, and the complex structure of 2.6 Å resolution was refined to an R_{cryst} of 19.3% and an R_{free} of 25.8%. Crystallographic and refinement statistics are shown

in Table 1. The Ramachandran plots drawn by the program PROCHECK (35) show that 98.6 and 98.9% of all residues in the free and complex structures fall within the most favored and additional allowed regions, respectively. Figures were drawn by using the programs RIBBONS (36) and BOBSCRIPT (37).

Construction of Alanine-Replacement Mutants of HzKR127. All HzKR127 mutants were constructed by recombinant PCR from the humanized heavy-chain plasmid pHKR127HC (16) or humanized light-chain plasmid pHKR127KC (16) by using mutagenic primers, as described previously (15). The mutated constructs were introduced into *Escherichia coli* DH5 α and verified by nucleotide sequencing. Finally, the mutated V_H or V_L was subcloned into the EcoRI–ApaI or HindIII–XbaI sites, respectively, of pDCMV–dhfr–AKA (14) containing human C γ 1 and C κ to construct heavy or light-chain expression plasmid. WT and mutant HzKR127 were transiently expressed in COS7 cells by cotransfection of the heavy and light-chain expression plasmids by using LipofectAMINE reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD) according to the protocol suggested by the supplier. The culture supernatants were harvested 2 days after transfections and stored at -70°C until use.

ELISA Analysis. All ELISAs were performed at 37°C, as previously reported (16). To determine the K_d , competition ELISAs were used. The 5- to 10-ng aliquots of antibodies from the culture supernatants were preincubated with various amounts of purified GST–preS1 (residues 1–56) in 400 μ l of PBS with Tween 20 that contained 0.2% BSA at 37°C for 3 h, and then mixtures were added to the wells that had been coated with 100 ng per well of GST–preS1 (residues 1–56). Plates were incubated for 30 min, followed by washing and detection.

This work was supported by the National Creative Research Initiative Program (Korea), the Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology Research Initiative Program, and Ministry of Health Welfare Grant A050260 (Korea).

- Dreesman GR, Sanchez Y, Ionescu-Matiu I, Sparrow JT, Six HR, Peterson DL, Hollinger FB, Melnick JL (1982) *Nature* 295:158–160.
- Ganem D, Varmus HE (1987) *Annu Rev Biochem* 56:651–693.
- Rehermann B, Nascimbeni M (2005) *Nat Rev Immunol* 5:215–229.
- Schodel F (1998) in *Hepatitis B Virus*, ed Koshy R, Caselmann WH (Imperial College Press, London), pp 219–250.
- Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP, Nabel GJ, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt RT (2004) *Nat Immunol* 5:233–236.
- Ferrantelli F, Ruprecht RM (2002) *Curr Opin Immunol* 14:495–502.
- Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH (1984) *J Virol* 52:396–402.
- Stibbe W, Gerlich WH (1983) *J Virol* 46:626–628.
- Neurath AR, Kent SB, Strick N, Parker K (1986) *Cell* 46:429–436.
- Pontisso P, Ruvoletto MG, Gerlich WH, Heermann KH, Bardini R, Alberti A (1989) *Virology* 173:522–530.
- Ryu CJ, Cho DY, Gripon P, Kim HS, Guguen-Guillouzo C, Hong HJ (2000) *J Virol* 74:110–116.
- De Falco S, Ruvoletto MG, Verdoliva A, Ruvo M, Raucchi A, Marino M, Senatore S, Cassani G, Alberti A, Pontisso P, et al. (2001) *J Biol Chem* 276:36613–36623.
- Neurath AR, Seto B, Strick N (1989) *Vaccine* 7:234–236.
- Yoon SO, Lee TS, Kim SJ, Jang MH, Kang YJ, Park JH, Kim KS, Lee HS, Ryu CJ, Gonzales NR, et al. (2006) *J Biol Chem* 281:6985–6992.
- Maeng CY, Ryu CJ, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Hong HJ (2000) *Virology* 270:9–16.
- Hong HJ, Ryu CJ, Hur H, Kim S, Oh HK, Oh MS, Park SY (2004) *Virology* 318:134–141.
- Wilson IA, Ghiara JB, Stanfield RL (1994) *Res Immunol* 1:73–78.
- Saphire EO, Parren PW, Pantophlet R, Zwick MB, Morris GM, Rudd PM, Dweck RA, Stanfield RL, Burton DR, Wilson IA (2001) *Science* 293:1155–1159.
- Zhou T, Xu L, Dey B, Hessel AJ, Van Ryk D, Xiang SH, Yang X, Zhang MY, Zwick MB, Arthos J, et al. (2007) *Nature* 445:732–737.
- Cardoso RM, Zwick MB, Stanfield RL, Kunert R, Binley JM, Katinger H, Burton DR, Wilson IA (2005) *Immunity* 22:163–173.
- Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C (1997) *J Mol Biol* 273:927–948.
- Hutchinson EG, Thornton JM (1996) *Protein Sci* 5:212–220.
- Lang S, Xu J, Stuart F, Thomas RM, Vrijbloed JW, Robinson JA (2000) *Biochemistry* 39:15674–15685.
- Muller YA, Chen Y, Christinger HW, Li B, Cunningham BC, Lowman HB, de Vos AM (1998) *Structure (London)* 6:1153–1167.
- Dall'Acqua W, Goldman ER, Lin W, Teng C, Tsuchiya D, Li H, Ysern X, Braden BC, Li Y, Smith-Gill SJ, et al. (1998) *Biochemistry* 37:7981–7991.
- Pons J, Rajpal A, Kirsch JF (1999) *Protein Sci* 8:958–968.
- Sundberg EJ, Mariuzza RA (2003) *Adv Protein Chem* 61:119–160.
- Stanfield RL, Gorny MK, Williams C, Zolla-Pazner S, Wilson IA (2004) *Structure (London)* 12:193–204.
- Iwahashi M, Milenic DE, Padlan EA, Bei R, Schlom J, Kashmiri SV (1999) *Mol Immunol* 36:1079–1091.
- Schneider WP, Glaser SM, Kondas JA, Hakimi J (1993) *J Immunol* 150:3086–3090.
- Leslie AG (1999) *Acta Crystallogr D* 55:1696–1702.
- Navaza J (1994) *Acta Crystallogr A* 50:157–163.
- Jones TA, Zou JY, Cowan SW, Kjeldgaard M (1991) *Acta Crystallogr A* 47:110–119.
- Brunker AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, et al. (1998) *Acta Crystallogr D* 54:905–921.
- Laskowski RA, Rullmann JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM (1996) *J Biomol NMR* 8:477–486.
- Carson M (1997) *Methods Enzymol* 277:493–505.
- Esnouf RM (1997) *J Mol Graphics Model* 15:132–134.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une a VEGF y que comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDRs y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDRs, en donde dicha región variable de la cadena ligera comprende:

- (a) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,
- (b) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y
- (c) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma; y

en donde dicha región variable de la cadena pesada comprende:

- (d) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,
- (e) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, y
- (f) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma,

en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de CDR dada, o en donde dicha secuencia sustancialmente homóloga es una secuencia que contiene sustituciones de aminoácidos conservativas de la secuencia de CDR dada, y en donde dicho anticuerpo aislado

- (i) se une al menos a VEGF humano y a VEGF de ratón, e
- (ii) inhibe significativamente la unión de VEGF al receptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) sin inhibir significativamente la unión de VEGF al receptor VEGFR1 (Flt-1).

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende tres CDRs y al menos una región variable de cadena ligera que comprende tres CDRs, en donde dicha región variable de cadena ligera comprende:

- (a) una CDR1 ligera variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8,
 - (b) una CDR2 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y
 - (c) una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; y
- en donde dicha región variable de la cadena pesada comprende:
- (d) una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5,
 - (e) una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y
 - (f) una CDR3 VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- y en donde dicho anticuerpo aislado
- (i) se une al menos a VEGF humano y a VEGF de ratón, e
 - (ii) inhibe significativamente la unión de VEGF al receptor VEGF VEGFR2 (de KDR/Flk-1) sin inhibir significativamente la unión de VEGF al receptor VEGF VEGFR1 (Flt-1).
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de la misma.
 4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha región variable de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de la misma.
 5. El anticuerpo de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde dicha región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y dicha región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
 6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a la misma.
 7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo completamente humano.

8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo completo que comprende una región constante de anticuerpo.
9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG.
10. El anticuerpo de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o una secuencia que tiene al menos 80% identidad de secuencia de la misma y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de la misma.
11. El anticuerpo de la reivindicación 10, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.
12. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo.
13. El anticuerpo de la reivindicación 12, en donde dicho fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, ds-scFv, Fd, DAB, TandAb dímero, anticuerpo lineal, minicuerpo, diacuerpo o fragmento de anticuerpo biespecífico.
14. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho anticuerpo tiene una afinidad de unión por VEGF que corresponde a una K_d de menos de 10 nM cuando dicho anticuerpo está en formato IgG.
15. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dicho anticuerpo está unido a al menos un primer agente de diagnóstico o terapéutico.
16. El anticuerpo de la reivindicación 15, en donde dicho anticuerpo está unido a al menos un primer agente radioterapéutico, agente quimioterapéutico, agente anti-angiogénico, agente inductor de apoptosis, fármaco anti-tubulina, agente anti-celular o citotóxico, esteroide, citoquina, quimioquina o coagulante.
17. El anticuerpo de la reivindicación 15, en donde dicho anticuerpo está unido a:
 - (a) un radioisótopo arsénico;
 - (b) taxol, docetaxel, paclitaxel, cisplatino, gemcitabina, una combretastatina, doxorubicina o adriamicina;
 - (c) un ricina, gelonina, abrina, difteria, Pseudomonas o la toxina pertussis;
 - (d) un inhibidor de la ATPasa de tipo en V;
 - (e) IL-2, IL-12, TNF- α , un interferón o LEC; o
 - (f) factor de Tejido truncado.

18. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, unido a al menos un primer agente terapéutico o de diagnóstico.
19. Una composición que comprende al menos un primer anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o un inmunoconjugado del mismo.
20. La composición de la reivindicación 19, en donde dicha composición es una composición farmacéuticamente aceptable.
21. La composición de la reivindicación 19 o la reivindicación 20, en donde dicha composición comprende además al menos un segundo agente terapéutico.
22. La composición de la reivindicación 21, en donde dicho al menos un segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.
23. La composición de la reivindicación 22, en donde dicho al menos un segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste de análogos de pirimidina, complejos de coordinación de platino, camptotecinas, inhibidores de tirosina quinasa e inhibidores de receptor de tirosina quinasas.
24. La composición de la reivindicación 23, en donde dicho al menos un segundo agente terapéutico es 5-fluorouracilo, capecitabina, oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, irinotecan, axitinib, sunitinib o paclitaxel.
25. Una molécula de ácido nucleico que comprende una región de secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.
26. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 25, en donde dicha región de secuencia de nucleótidos codifica un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de la misma.
27. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 26, en donde dicha región de secuencia de nucleótidos tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 20.
28. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 25, en donde dicha región de nucleótidos codifica un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de la misma y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de la misma.

29. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 28, en donde dicha región de secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 24 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 22 y en donde dicha región de secuencia de nucleótidos que codifica la región de la SEQ ID NO: 25 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 23.
30. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29.
31. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29 o el vector de expresión de la reivindicación 30.
32. Un virus que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29 o el vector de expresión de la reivindicación 30.
33. Un kit que comprende, en por lo menos un primer recipiente:
- (a) el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17;
 - (b) el inmunoconjugado de la reivindicación 18;
 - (c) la composición de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24;
 - (d) la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29;
 - (e) el vector de expresión de la reivindicación 30;
 - (f) la célula huésped de la reivindicación 31, o
 - (g) el virus de la reivindicación 32.
34. Un método de producción de un anticuerpo, que comprende:
- (a) cultivar una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 30 bajo condiciones efectivas para expresar el anticuerpo codificado; y
 - (b) obtener el anticuerpo expresado a partir de dicha célula huésped.
35. Un método de unión de VEGF, que comprende poner en contacto una composición que comprende VEGF con el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o un inmunoconjugado del mismo.
36. Un método *in vitro* de detección de VEGF, que comprende poner en contacto una composición sospechosa de contener VEGF con el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o un inmunoconjugado del mismo, bajo condiciones efectivas para permitir la formación de complejos VEGF/anticuerpo y detectar los complejos así formados.