

581 182

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

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

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 540 0860
FAX: (57-1) 381 9660

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Trámite : 011 Evento : 379 Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 04.041.969
Asunto : Solicitud de Patente para **MOLECULAS DE ANTICUERPO
CON ESPECIFICIDAD PARA RDQ PARA PREVENIR LA
INTERACCION ENTRE FCVE Y RDQ, Y EL USO Y
METODO PARA LA PRODUCCION DE LAS MISMAS.**
Solicitante : **CELLTECH R&D LIMITED**
Fecha de Solicitud : 6 de mayo de 2004

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al Oficio No. **15937** notificado por fijación en lista del 7 de diciembre de 2007.

2. Mediante mi memorial de fecha 25 de febrero de 2008 solicité un plazo de 30 días para atender el Oficio No. **15937**.

3. Mediante el Oficio No. **15937** se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente.

Atiendo a las observaciones de la manera siguiente:

3.1 CLARIDAD DE LA SOLICITUD Y REIVINDICACIONES DE USO.

Para subsanar las objeciones que sobre claridad y por incluir reivindicaciones de uso hizo su Despacho, presento nuevo pliego reivindicatorio con 26 reivindicaciones en la cual se han hecho cambios que permiten apreciar claramente el objeto reivindicado en la presente solicitud de patente. Las modificaciones efectuadas fueron las siguientes:

- Las reivindicaciones 1-8, 10-13, 18-21 y 37-41 han sido eliminadas de este pliego reivindicatorio.
- Las reivindicaciones 2, 3 y 5 se han corregido para referirse a "amino ácidos 22 a 235 de la SEQ ID NO:11" y "amino ácidos 22 a 249 de la SEQ ID NO: 12". A este respecto, respetuosamente ponemos de presente que los amino ácidos 1-21 de las SEQ ID Nos. 11 y 12 son la secuencia de señal OmpA de E. coli, que se cliva durante el procesamiento y no está presente en el Fab del anticuerpo final. Así, las Figuras 4 y 5 son claras en que la SEQ ID NO:11 y la SEQ ID NO:12 contienen dichas "secuencias de señal".

De esta forma, es importante aclarar que la persona versada en la materia sabría que los amino ácidos 1-21 de las Figuras 4 y 5 equivalen a la secuencia de señal OmpA, ya que la secuencia de señal es conocida (ver Movva et al., JBC, 255(1):27-29). Adicionalmente, cuando los amino ácidos 1-21 se remueven de la SEQ ID NO:11 y la SEQ ID NO:12 el terminal N resultante de los Fab corresponde a los mismos del terminal N del gH3 y gL3, como se muestra en la SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:16.

- La nueva reivindicación 8 (antigua reivindicación 22) se ha corregido para referirse a "uno de los residuos cisteína en el extremo del terminal C de su cadena pesada". A este respecto, ponemos de presente que dicha corrección clarifica el sitio de unión de la molécula indicadora o efectora, lo cual está debidamente sustentado en la descripción.
- La nueva reivindicación 22 (antigua reivindicación 36) se ha corregido para especificar que la composición contiene una molécula de anticuerpo de la invención "en combinación con un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable". EL soporte para dicha corrección se encuentra en la página 22 de la solicitud.

- Las nuevas reivindicaciones 6, 7 y 23-26 se encuentran soportadas en la página 12 y 13, 14 y 16 de la descripción respectivamente.

De esta manera es claro que con las anteriores modificaciones del capítulo reivindicatorio quedan subsanadas las objeciones que por claridad y por incluir reivindicaciones de uso hizo su Despacho, ya que ahora, dicho pliego se dirige a moléculas de anticuerpo que contienen una secuencia de amino ácido de región variable de cadena pesada específica (SEQ ID NO:15) y una secuencia de amino ácido de región variable de cadena liviana específica (SEQ ID NO:16). Por lo tanto las secuencias CDR y las secuencias de región de estructura se especifican con claridad, están debidamente sustentadas por los datos experimentales en la solicitud y permiten determinar el alcance de la protección reivindicada y compararla frente al estado del arte, de acuerdo con las disposiciones de los artículos 14 y 30 de la Decisión 486.

3.2 NIVEL INVENTIVO

A este respecto, es importante poner de presente que el examen de nivel inventivo está dirigido a determinar si la invención reivindicada había sido sugerida o enseñada en el estado del arte, de acuerdo con el conocimiento de un técnico medio en la materia. Para los anteriores efectos, el método problema-solución le indica al Examinador que al realizar el examen de nivel inventivo debe verificar las enseñanzas del arte previo sin adoptar la posición de un inventor que se preguntaría cómo solucionar el problema técnico en cuestión.

Lo anterior, por cuanto si se adopta la posición del inventor y se tiene conocimiento tanto del arte previo como de la forma como efectivamente se solucionó el problema técnico, la invención en todos los casos le resultará obvia y evidente.

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que el mencionado método problema-solución también señala que los documentos del estado del arte frente a los cuales se debe

184
185

efectuar el examen de nivel inventivo son aquellos que dentro del mismo campo técnico estén dirigidos a solucionar el mismo problema. Lo anterior, por cuanto estos son los documentos que se presume debieron ser de conocimiento del inventor para a partir de ellos formular su invención. Así los documentos relacionados con otro campo técnico o dirigidos a solucionar cualquier otro problema no serían relevantes para estos efectos en la medida que no harían parte del grupo de documentos de los cuales el inventor hubiera podido derivar de manera obvia y evidente su invención.

De acuerdo con lo anterior, procederemos a indicar las razones por las cuales los documentos citados no afectan el nivel inventivo de la presente solicitud de patente. Veamos:

Ese Despacho afirma que el documento D1 afecta el nivel inventivo de la presente solicitud, toda vez que considera que los productos y procedimientos relacionados en la solicitud eran del conocimiento de un técnico medio al momento de la invención, y ya que el desarrollo reclamado se deriva evidentemente del estado de la técnica y por lo tanto carece de actividad inventiva.

A este respecto, respetuosamente ponemos de presente que teniendo en cuenta las anteriores modificaciones al pliego reivindicatorio, el mismo es inventivo, toda vez que las moléculas de anticuerpo reivindicadas son moléculas humanizadas con secuencias específicas, que se unen al KDR con afinidad muy alta, y la persona experta no podría haber esperado obtener moléculas humanizadas con tan altas afinidades de unión como las aquí reivindicadas.

Así, D1 describe el clon p1C11 scFv de murino, que tiene una afinidad para el KDR humano de $2.1 \times 10^{-9}M$ (ver Tabla 2). Las moléculas de anticuerpo scFv son monovalentes, es decir, ellas solo contienen una región variable de cadena pesada y solo una región variables de cadena liviana, y solo tienen un sitio de unión a antígeno. Por el contrario, los ejemplos de la presente solicitud detallan moléculas de anticuerpo

monovalentes que contienen las secuencias de región variable CDR-injertadas reivindicadas, las cuales se unen al KDR humano con una afinidad de $9.1 \times 10^{-10}M$ (ésta es la afinidad para una molécula Fab PEGilada – designada "Fab" en la Tabla 1). Así, las moléculas de anticuerpo monovalentes que contienen las secuencias de región variable CDR-injertadas reivindicadas tienen **por lo menos una afinidad dos veces mayor** para un KDR humano que el clon p1C11 scFv de murino descrito en D1.

De la misma forma, D1 describe una versión quimérica divalente del anticuerpo p1C11, es decir, uno que contiene dos regiones variables de cadena pesada de murino y dos regiones variables de cadena liviana de murino, y que tiene dos sitios de unión a antígeno. La versión quimérica divalente del anticuerpo p1C11 tiene una afinidad para el KDR humano de $0.82 \times 10^{-9}M$ (aproximadamente equivalente a la afinidad con la cual el VEGF une el KDR: ver Tabla 2). Por el contrario, en los ejemplos de la presente solicitud, las moléculas de anticuerpo divalente que contienen las secuencias de región variable CDR-injertadas reivindicadas se unen al KDR humano con una afinidad de $0.29 \times 10^{-10}M$ (ésta es la afinidad para una molécula maleimida di-Fab no PEGilada – designada "DFM" en la Tabla 1). Por lo tanto, las moléculas de anticuerpo divalente que contienen las secuencias de región variable CDR-injertadas reivindicadas tienen por lo menos **una afinidad veinticinco veces mayor** para KDR que el anticuerpo p1C11 quimérico divalente en D1.

Por lo tanto, toda vez que no hay descripción en D1 de ninguna molécula de anticuerpo que tenga una afinidad de unión tan alta como aquellas en la Tabla 1 de la presente solicitud, ya que dicho documento describe únicamente anticuerpos que se unen al KDR con una afinidad comparable con el VEGF, en donde el VEGF se une al KDR con una afinidad de $0.93 \times 10^{-9}MK$; las moléculas de anticuerpo aquí reivindicadas no habrían sido obvias puesto que la persona experta no habría esperado que fuera posible obtener moléculas de anticuerpo con afinidades de unión tan altas como aquellas en esta solicitud.

Adicionalmente, deseamos llamar la atención del señor Examinador al hecho que sí bien numerosos anticuerpos anti-KDR se generan y prueban en D1, la afinidad de unión de las

moléculas de anticuerpo reivindicadas es por lo menos dos veces (para las moléculas monovalentes) o veinticinco veces (para las moléculas divalentes) mayor que cualquiera de las moléculas de anticuerpo cuya afinidad se da en la Tabla 1 de D1.

Por lo tanto, D1 proporciona actualmente evidencia de que la materia reivindicada no es obvia, ya que demuestra cómo intentos anteriores para identificar las moléculas de anticuerpo anti-KDR de alta afinidad no han obtenido ningún anticuerpo con afinidad de unión tan alto como aquellos reivindicados por mí representada.

Así mismo, la presente solicitud proporciona moléculas de anticuerpo que se han humanizado por injertos CDR, mientras los ejemplos D1 solo describen anticuerpos de murino y quiméricos. Las reivindicaciones se dirigen por lo tanto a moléculas de anticuerpo que no solo tienen afinidades sorprendentemente altas para el KDR, sino que también son inmunológicamente superiores a los anticuerpos en D1. Por consiguiente, no habría sido obvio a partir de D1 que las moléculas de anticuerpos con tales altas afinidades de unión para el KDR se pudieran obtener en el contexto de moléculas de anticuerpo humanizadas, es decir, moléculas que comprenden las secuencias de estructura de región variable humana.

Esta es una distinción muy importante sobre los anticuerpos de D1 citados por el Examinador, ya que la persona versada en el arte podría esperar que la humanización de un anticuerpo por injerto CDR resultara en una reducción en la afinidad de unión a antígeno. Por ejemplo, en experimentos reportados por Queen et al. (PNAS, 1989, 86:10029-10083), un anticuerpo humanizado por injerto CDR solo tiene 1/3 de afinidad de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal de murino inicial. Por lo tanto, la persona experta no habría esperado a partir de los conocimientos revelados por Queen et al. que las moléculas de anticuerpo anti-KDR humanizadas tuvieran afinidades de unión tan altas como aquellas que se observan en la Tabla 1.

Finalmente, respetuosamente ponemos de presente que las moléculas de anticuerpo reivindicadas no son únicamente "alternativas" a los anticuerpos descritos en D1, sino son

moléculas de anticuerpo completamente diferentes. Las moléculas de anticuerpo reivindicadas son moléculas humanizadas que comprenden secuencias de estructura humana y secuencias CDR de murino, así que no son del mismo tipo de las moléculas como los anticuerpos quiméricos descritos en los ejemplos de D1 que tienen regiones completamente variables de murino. Por lo tanto, no es preciso sugerir que la persona experta pueda haber modificado simplemente los anticuerpos descritos en D1 para alcanzar las moléculas de anticuerpo reivindicadas. Aún si la persona experta ha modificado las secuencias CDR de los anticuerpos descritos en D1 en un intento por mejorar sus afinidades (una aproximación que parece ser sugerida por el Examinador), ellos no habrían podido alcanzar la materia objeto reivindicada que requiere las secuencias de estructura de región variable humana específica.

Por lo tanto, toda vez que a partir de las enseñanzas de D1 no sería obvio para un técnico versado en el campo obtener moléculas de anticuerpo que contienen las secuencias de región variable humanizadas específicas que proporcionan estas sorprendentes ventajas; se puede concluir que la invención de mi representada goza de nivel inventivo a la luz de dichas anterioridades.

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

4. **Anexos:**

- 4.1. Nuevo pliego reivindicatorio con 26 reivindicaciones;
- 4.2. Formulario para modificaciones;
- 4.3. Recibo por valor de \$103.000 por concepto de modificaciones en solicitud pendiente.
- 4.4. Movva et al. "Amino acid sequence of the signal peptide of ompA protein, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*", JBC, 255(1):27-29.

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1	SOLICITUD DE:	
	☐ Corrección de Error Material	☒ Modificación a una solicitud
2	SOLICITANTE	
	Nombre: CELLTECH R&D LIMITED Sociedad constituida y existente bajo las leyes del estado del Reino Unido.	
	Dirección: 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, Reino Unido	
	Domicilio: Berkshire, Reino Unido	
	Teléfono: 546 09 70 E-mail: clientes@cavelier.com	Fax: 249 40 70
	IDENTIFICACION	
	C.C. ☐	NIT ☐
	C.E. ☐	Otro ☐
	Número: _____	
3	REPRESENTANTE O APODERADO	
	Nombre: Emilio FERRERO	
	Dirección: Carrera 4ª No. 72-35	
	Teléfono: 347 36 11 E-mail: cavelier@cavelier.com	Fax: 217 92 11
	IDENTIFICACION	
	C.C. ☒	NIT ☐
	C.E. ☐	Otro ☐
	Número: 438.019 TP 31.929	
4	Número de expediente: 04.041.969	
5	Descripción de la corrección o modificación solicitada: Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 26 reivindicaciones con el fin de superar las objeciones hechas por Su Despacho a la presente solicitud de Patente y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones.	
6	Comprobante de pago No. 08-28.117	Fecha: 7 de abril de 2008
7	Anexos	
	☒ Comprobante de pago de la tasa por valor de \$103.000.00 por concepto de modificaciones.	
	☐ Poderes, si fuere el caso	
	☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.	
8	NOMBRE: EMILIO FERRERO FIRMA: 	
	C.C. 438.019 de Usaquén T.P.A. 31.929	

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para el KDR humano, que comprende la región variable de cadena pesada gH3 (SEQ ID No. 15) y la región variable de cadena liviana gL3 (SEQ ID No. 16).
2. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena liviana que tiene la secuencia dada en los aminoácidos 22 a 235 de la SEQ ID No. 11 y una cadena pesada que tiene la secuencia dada en los aminoácidos 22 a 249 de la SEQ ID No. 12.
3. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena liviana que tiene la secuencia dada en los aminoácidos 22 a 235 de la SEQ ID No. 11.
4. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, que tiene una cadena pesada que tiene la secuencia dada en la SEQ ID No. 57.
5. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, que tiene una cadena liviana que comprende la secuencia dada en los aminoácidos 22 a 235 de la SEQ ID No. 11 y una cadena pesada que tiene la secuencia dada en la SEQ ID No. 57.
6. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es una molécula completa de anticuerpo.
7. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es un fragmento Fab, un fragmento Fab modificado, un fragmento di-Fab, un fragmento di-(Fab modificado), un fragmento Fab'. Un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv, un fragmento Fv de cadena sencilla.
8. Un compuesto que comprende una molécula de anticuerpo de la reivindicación 2 que tiene unido covalentemente a uno de los residuos cisteína en el extremo del terminal C de su cadena pesada una molécula indicadora o efectora.
9. El compuesto de la reivindicación 8, que comprende una molécula efectora.
10. El compuesto de la reivindicación 9, en donde la molécula efectora comprende uno o más polímeros.

11. El compuesto de la reivindicación 10, en donde uno o más polímeros es/son un polímero polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena recta o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado.
12. El compuesto de la reivindicación 11, en donde uno o más polímeros es/son un metoxipoli(Etilenglicol).
13. Un compuesto de la reivindicación 8 que tiene a uno de los residuos cisteína en el extremo del terminal C de la cadena pesada un grupo lisil-maleimida o lisil bis-maleimida en donde cada grupo amino del residuo lisilo ha ligado covalentemente a este un residuo metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20,000 Da.
14. Una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada y/o liviana de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
15. Un vector de expresión o clonación que contiene la secuencia de ADN de la reivindicación 14.
16. Un vector de expresión de E. coli que comprende la secuencia de ADN de la reivindicación 14.
17. El vector de expresión de E. coli de la reivindicación 16 que es pTTOD(CDP791).
18. Una célula anfitriona transformada con el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17.
19. Un proceso para la producción de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 18 y aislar la molécula de anticuerpo.
20. Un proceso para la producción de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende cultivar E. coli que comprende un vector de expresión de E. coli que comprende la secuencia de ADN de la reivindicación 14 y aislar la molécula de anticuerpo.

21. El proceso de la reivindicación 20 en donde la molécula de anticuerpo es objetivo para el periplasma.
22. Una composición de diagnóstico o terapéutico que comprende la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 en combinación con un excipiente, diluyente, o un portador farmacéuticamente aceptable.
23. Un di(Fab modificado) PEGilado en el que cada Fab modificado comprende una cadena liviana que tiene la secuencia dada en los aminoácidos 22 a 235 de la SEQ ID No. 11 y una cadena pesada que tiene la secuencia dada en los aminoácidos 22 a 249 de la SEQ ID No. 12.
24. El di(Fab modificado) PEGilado de la reivindicación 23, que comprende por lo menos una molécula mPEG:
25. El di(Fab modificado) PEGilado de la reivindicación 24, en donde cada mPEG se liga a un residuo lisina unido covalentemente a un ligador bis-maleimida.
26. El di(Fab modificado) PEGilado de la reivindicación 24 o reivindicación 25, en donde cada molécula mPEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20,000 Da.

Communication

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 255, No. 1, Issue of January 10, pp. 27-33, 1980
Printed in U.S.A.

Amino Acid Sequence of the Signal Peptide of ompA Protein, a Major Outer Membrane Protein of *Escherichia coli**

(Received for publication, October 22, 1979)

N. Rao Movva, Kenzo Nakamura, and Masayori Inouye

From the Department of Biochemistry, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, New York 11794

The structural gene for ompA protein, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*, was cloned using the plasmid cloning vehicle, pMF21. The DNA sequence corresponding to the signal peptide of pro-ompA protein, a secretory precursor of ompA protein, was determined. The amino acid sequence of the signal peptide was deduced from the DNA sequence as follows: Met⁻²¹-Lys-Lys-Thr-Ala-Ile-Ala-Ile-Ala-Val-Ala-Leu-Ala-Gly⁻¹⁰-Phe-Ala-Thr-Val-Ala-Gln-Ala⁻¹. The amino acid sequence complies with all the features of the loop model proposed for the mechanism of protein secretion across the cytoplasmic membrane.

Escherichia coli provides an excellent system for studying the mechanism of protein secretion across the membrane. Outer membrane proteins as well as periplasmic proteins and some cytoplasmic membrane proteins of *E. coli* have been shown to be produced from precursors with peptide extensions at their NH₂-terminal ends (signal peptide) (see Ref. 1 for review). On the basis of the structural analysis of the amino acid sequences of the signal peptides so far determined, a model (loop model) has been proposed to explain the function of the signal peptide in protein secretion across the membrane (1-3). In this model, proteins are secreted across the membrane by forming a loop at the signal peptide. The cleaved signal peptide is then left in the membrane. On the other hand, in the signal hypothesis proposed by Blobel and Dobberstein (4), the signal peptides are linearly secreted across the membrane (linear model).

In the present paper, we have determined the amino acid sequence of the signal peptide of another major outer membrane protein of *E. coli*, ompA (tolG) protein. This protein has been previously shown to be produced from a precursor (pro-ompA protein or pro-tolG protein) (5-7). The amino acid sequence thus determined was found to comply with all the features proposed for the functions of the signal peptide in the loop model (1).

* This work was supported by Grant GM 19043 from the United States Public Health Service and Grant BC-67 from the American Cancer Society. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—[γ-³²P]ATP (9000 Ci/mmol) prepared from carrier-free (³²P)orthophosphate (New England Nuclear) and ADP (Sigma), by the method of Johnson and Walseth (8), was used for DNA sequencing. All restriction enzymes used were obtained from New England Biolabs.

Bacterial Strains—*E. coli* KLF6/KLI81 (obtained from Dr. B. Bachmann) was used for isolation of F'106 DNA. *E. coli* RM7 *recA* ompA was constructed from *E. coli* W620 (obtained from Dr. B. Bachmann) and used as recipient for isolation of clones of the ompA gene.

Preparation of DNA—F'106 DNA and pMF21 DNA were prepared according to the method of Clewell and Helinski (9).

DNA Sequencing—All sequencing procedures are from Maxam and Gilbert (10).

RESULTS

Cloning of ompA Gene—It has been shown that F-factor, F'106, carries the structural gene for ompA protein (11). Therefore, we used F'-106 DNA to clone the ompA gene using pMF21 as a cloning vehicle. *Bam* HI fragments of F'106 DNA were mixed with *Bam* HI-linearized plasmid vector pMF21 DNA (12) and treated with T4-DNA ligase (13).

Transformation was carried out with the use of *E. coli* RM7 as recipient. About 1000 kanamycin-resistant transformants were isolated and they were then examined for their sensitivity to phages K3 and TuII*. Two transformants were found to be phage-sensitive. Plasmid DNAs isolated from these transformants conferred phage sensitivity to six independently isolated ompA⁻ strains of *E. coli* after transformation, indicating that the plasmids carry the ompA gene functions. When these plasmid DNAs were digested with *Bam* HI, both contained a 1.7-kilobase pair fragment in addition to pMF21 DNA (data not shown). One of these plasmids was designated as pRM111 and used for further analysis. The *Bam* HI digest of F'106 DNA contained a 1.7-kilobase pair fragment, which disappeared when F'-106 ompA⁺ was mutagenized by insertion of phage Mu to F'-106 ompA⁻.¹ However, when the membrane proteins from the transformants were analyzed by sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis, ompA protein was not detected. These results suggest that a portion of the ompA gene is missing in pRM111, resulting in the production of a shorter ompA protein, which is still capable of conferring phage sensitivity to the resistant cells. This is confirmed from the DNA sequence analysis as will be discussed later.

DNA Sequencing—In order to determine the amino acid sequence of the signal peptide of pro-ompA protein, we searched for a DNA fragment which contained the DNA sequence corresponding to the amino acid sequence of the NH₂-terminal end of ompA protein, Ala-Pro-Lys-Asp-Asn-Thr-Trp (14). When 1.7-kilobase pair *Bam* HI fragment purified from pRM111 was digested with *Hinf*I, four fragments of 950, 450, 320, and 80 base pairs were obtained. The fragments of 450, 320, and 80 base pairs were sequenced, but none of them were found to contain a DNA sequence which could code for the NH₂-terminal region of ompA protein.

The 950-base pair fragment was further digested with *Alu* I, which resulted in four fragments of 310, 270, 270, and 100 base pairs. They were designated as FA1, FA2, FA2, and FA3, respectively. Mapping of restriction enzyme cleavage

¹ R. Movva and M. Inouye, unpublished results.

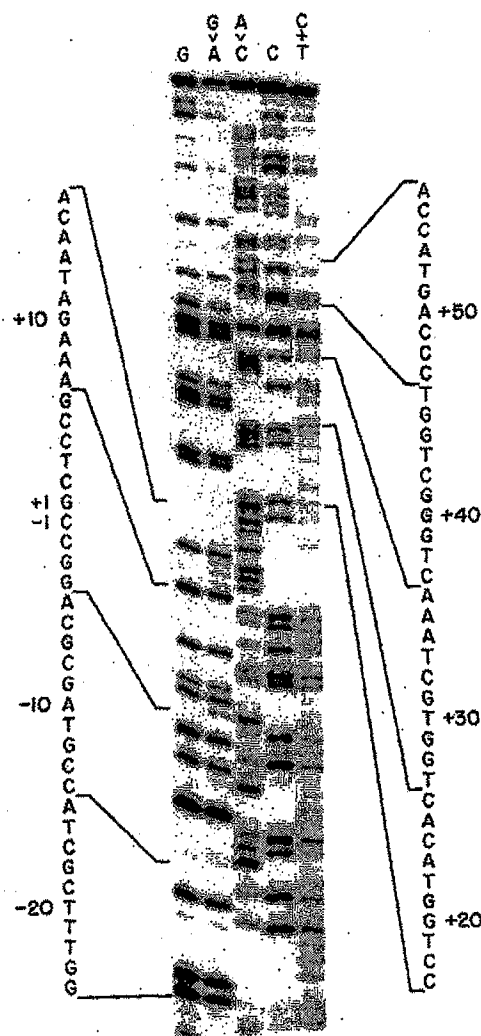
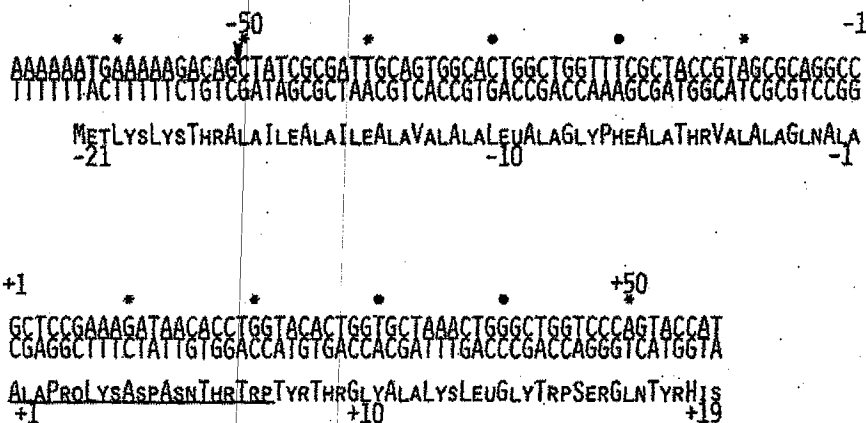


FIG. 1. DNA sequencing gel corresponding to the ompA protein sequence from Gly at position -8 to Tyr at position +18. The *Alu* I fragment of 270 base pairs (FA2; see text) was end-labeled with [^{32} P]ATP using polynucleotide kinase and was digested with *Bst* EII. The singly end-labeled 180-base pair *Alu* I/*Bst* EII was purified on 5% polyacrylamide gel, and sequenced according to Maxam and Gilbert (10). The cleavage products were applied as indicated in the figure on a 10% polyacrylamide gel in 7 M urea and run at constant power of 350 watts for 2½ h. In the figure, the first base of the codon for the NH₂-terminal alanine residue of ompA protein is numbered as +1.

FIG. 2. DNA sequence corresponding to the NH₂-terminal region of pro-ompA protein. The amino acid sequence was deduced from the DNA sequence and the NH₂-terminal alanine residue to ompA protein was numbered as +1. The amino acid sequence underlined is identical with the NH₂-terminal sequence of ompA protein determined by Endermann *et al.* (14). An arrow indicates the cleavage site for restriction enzyme, *Alu* I.



sites indicated that these fragments are arranged as FA2-FA2_b-FA1-FA3 in the 950-base pair *Hinf*I-*Bam* HI fragment (data not shown). Searching for a DNA sequence corresponding to the NH₂-terminal sequence of ompA protein, it was found that the left half (about 180 base pairs) of FA2_a derived from *Bst* EII digestion contained the DNA sequence corresponding to the NH₂-terminal sequence as shown in Figs. 1 and 2. Since a part of the amino acid sequence was not covered by FA2_a, the right half (about 80 base pairs) of FA2_a derived by *Msp* I digestion was also sequenced. The DNA sequence in this region was thus determined as shown in Fig. 2.

DISCUSSION

The DNA sequence from +1 to +21 (Figs. 1 and 2) can code for the amino acid sequence of Ala-Pro-Lys-Asp-Asn-Thr-Trp which is exactly the same as the NH₂-terminal sequence of ompA protein determined by Endermann *et al.* (14). This confirms that pRM111 contains at least a part of the structural gene for ompA protein. Furthermore, the DNA sequence reveals the existence of the peptide extension at the NH₂-terminal end of ompA protein, since there is no initiation

codon ATG, immediately before GCT for the NH₂-terminal alanine residue. The initiation codon can be found only at -63 to -61 position, indicating that the signal peptide consists of 21 amino acid residues. Its amino acid sequence is deduced from the DNA sequence and shown in Fig. 2.

The existence of a precursor of ompA protein which has a peptide extension of about 20 amino acid residues was previously predicted (5). The present result has clearly confirmed that prediction. Furthermore, the amino acid sequence of the signal peptide of pro-ompA protein complies with all of the four rules for the properties of the signal peptide, proposed in the loop model (1). (a) The NH₂-terminal portion has a basic character due to the presence of 2 lysine residues. (b) A long stretch of hydrophobic amino acid residues exists between the basic NH₂-terminal portion and the cleavage site. (c) There is a glycine residue almost at the center of the hydrophobic section. (d) The amino acid residue at the cleavage site (-1 position) is an alanine residue. It should also be noted that this signal peptide contains a large number of alanine residues, which are found at almost every other position.

The present study indicates that pRM111 is missing a part of the gene which codes for the COOH-terminal region of ompA protein. The structural gene of ompA protein in pRM111 resides in FA2_a-FA1-FA3 which accounts for about 680-base pair or 227 amino acid residues. The total number of amino acid residues in ompA protein has been reported to be around 285 (15, 16). Therefore, ompA protein coded by pRM111 appears to be missing a COOH-terminal portion of

195
196

about 74 amino acid residues (58 plus 16 for the signal peptide coded by FA2₆). This result indicates that the NH₂-terminal portion of ompA protein is responsible for conferring phage sensitivity, which has been previously shown by an *in vitro* experiment (17).

Currently we are attempting to isolate the entire *ompA* gene by using the 950-base pair *HinfI*-*Bam* HI fragment as a hybridization probe.

Acknowledgments—We thank Dr. Y. Hirota of the National Institute of Genetics, Mishima, Japan for pMF21 DNA, and Dr. B. Bachmann for the bacterial strains used in the present study. We are also grateful to Mr. K. Grasing for his skillful assistance.

REFERENCES

1. Inouye, M., and Halegoua, S. (1979) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, in press
2. Inouye, S., Wang, S., Sekizawa, J., Halegoua, S., and Inouye, M. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 1004-1008
3. DiRienzo, J. M., Nakamura, K., and Inouye, M. (1978) *Annu. Rev. Biochem.* 47, 481-532
4. Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975) *J. Cell Biol.* 67, 835-851
5. Sekizawa, J., Inouye, S., Halegoua, S., and Inouye, M. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 1126-1133
6. Halegoua, S., and Inouye, M. (1979) *J. Mol. Biol.* 130, 39-61
7. DiRienzo, J. M., and Inouye, M. (1979) *Cell* 17, 155-161
8. Johnson, R. A., and Walseth, T. F. (1979) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 10, 135-167, Raven Press, New York
9. Clewell, D. B., and Helinski, D. R. (1970) *Biochemistry* 9, 4428-4440
10. Maxam, A. M., and Gilbert, W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 560-564
11. Datta, D. B., Kramer, C., and Henning, U. (1976) *J. Bacteriol.* 128, 834-841
12. Manis, J. J., and Kline, B. C. (1977) *Mol. & Gen. Genet.* 152, 175-182
13. deVries, F. A. J., Collins, C. J., and Jackson, D. A. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 435, 213-227
14. Endermann, R., Hindennach, I., and Henning, U. (1978) *FEBS Lett.* 88, 71-74
15. Chai, T., and Foulds, J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 493, 210-215
16. Garten, W., Hindennach, I., and Henning, U. (1975) *Eur. J. Biochem.* 59, 213-221
17. Schweizer, M., Hindennach, I., Garten, W., and Henning, U. (1978) *Eur. J. Biochem.* 82, 211-217

A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor

(chimeric antibody/antibody affinity/autoimmune disease)

CARY QUEEN*, WILLIAM P. SCHNEIDER*, HAROLD E. SELICK†, PHILIP W. PAYNE*,
NICHOLAS F. LANDOLFI*, JAMES F. DUNCAN‡, NEVENKA M. AVDALOVIC*, MICHAEL LEVITT§,
RICHARD P. JUNGHANS¶, AND THOMAS A. WALDMANN¶

*Protein Design Labs, 3181 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304; †Department of Cell Biology, Stanford University, Stanford, CA 94305; and ‡Metabolism Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892

Contributed by Thomas A. Waldmann, August 30, 1989

ABSTRACT The anti-Tac monoclonal antibody is known to bind to the p55 chain of the human interleukin 2 receptor and to inhibit proliferation of T cells by blocking interleukin 2 binding. However, use of anti-Tac as an immunosuppressant drug would be impaired by the human immune response against this murine antibody. We have therefore constructed a "humanized" antibody by combining the complementarity-determining regions (CDRs) of the anti-Tac antibody with human framework and constant regions. The human framework regions were chosen to maximize homology with the anti-Tac antibody sequence. In addition, a computer model of murine anti-Tac was used to identify several amino acids which, while outside the CDRs, are likely to interact with the CDRs or antigen. These mouse amino acids were also retained in the humanized antibody. The humanized anti-Tac antibody has an affinity for p55 of $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, about 1/3 that of murine anti-Tac.

The cellular receptor for the lymphokine interleukin 2 (IL-2) plays an important role in regulation of the immune response (reviewed in ref. 1). The complete IL-2 receptor (IL-2R) consists of at least two IL-2-binding peptide chains: the p55 or Tac peptide (2, 3), and the recently discovered p75 peptide (4, 5). Identification and characterization of the p55 peptide were facilitated by the development of a monoclonal antibody, anti-Tac, which binds to human p55 (2). The p55 peptide was found to be expressed on the surface of T cells activated by an antigen or mitogen but not on resting T cells. Treatment of human T cells with anti-Tac antibody strongly inhibits their proliferative response to antigen or to IL-2 by preventing IL-2 binding (3, 6).

These results suggested that anti-IL-2R antibodies would be immunosuppressive when administered *in vivo*. Indeed, injection of an anti-IL-2R antibody into mice and rats greatly prolonged survival of heart allografts (7, 8). Anti-IL-2R was also effective in rats against experimental graft-versus-host disease (9). In animal models of autoimmune disease, an anti-IL-2R antibody alleviated insulinitis in nonobese diabetic mice and lupus nephritis in NZB $\times$ NZW mice (10). Anti-Tac itself was highly effective in prolonging survival of kidney allografts in cynomolgus monkeys (11).

In human patients, the specificity of anti-Tac for activated T cells might give it an advantage as an immunosuppressive agent over OKT3 (monoclonal anti-CD3), which is effective in treating kidney transplant rejection (12), but which suppresses the entire peripheral T-cell population. In fact, in phase I clinical trials for kidney transplantation, prophylactic administration of anti-Tac significantly reduced the incidence of early rejection episodes, without associated toxicity (13). Furthermore, treatment with anti-Tac induced temporary

partial or complete remission in three of nine patients with Tac-expressing adult T-cell leukemia (14). However, as a murine monoclonal antibody, anti-Tac elicits a strong human antibody response against itself, as does OKT3 (15). This response would prevent its long-term use in treating autoimmune conditions or suppressing organ transplant rejection.

The immune response against a murine monoclonal antibody may potentially be reduced by transforming it into a chimeric antibody. Such antibodies, produced by methods of genetic engineering, combine the variable (V) region binding domain of a mouse (or rat) antibody with human antibody constant (C) regions (16-18). Hence, a chimeric antibody retains the binding specificity of the original mouse antibody but contains less amino acid sequence foreign to the human immune system. Chimeric antibodies have been produced against a number of tumor-associated antigens (19-21). In some but not all cases, the chimeric antibodies have mediated human complement-dependent cytotoxicity (CDC) or antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) more efficiently than the mouse antibodies (21).

When the murine antibody OKT3 is used in human patients, much of the resulting antibody response is directed against the V region of OKT3 rather than the C region (15). Hence, chimeric antibodies in which the V region is still nonhuman may not have sufficient therapeutic advantages over mouse antibodies. To further reduce the immunogenicity of murine antibodies, Winter and colleagues constructed "humanized" antibodies in which only the minimum necessary parts of the mouse antibody, the complementarity-determining regions (CDRs), were combined with human V region frameworks and human C regions (22-25). We report here the construction of chimeric and humanized anti-Tac antibodies.¶ For the humanized antibody, sequence homology and molecular modeling were used to select a combination of mouse and human sequence elements that would reduce immunogenicity while retaining high binding affinity.

MATERIALS AND METHODS

Construction of Plasmids. cDNA cloning was by the method of Gubler and Hoffman (26), and sequencing was by the dideoxy method (27). The plasmid pVκ1 (Fig. 1A) was constructed from the following fragments: an approximately 4550-base-pair (bp) *Bam*HI-*Eco*RI fragment from the plas-

Abbreviations: IL-2R, interleukin 2 receptor; CDR, complementarity-determining region; CDC, complement-dependent cytotoxicity; ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity; V, variable; J, joining; C, constant.

†Present address: Biospan, 440 Chesapeake Drive, Redwood City, CA 94063.

‡Present address: Beckman Instruments, 1050 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304.

§The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank data base (accession nos. M28250 and M28251).

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

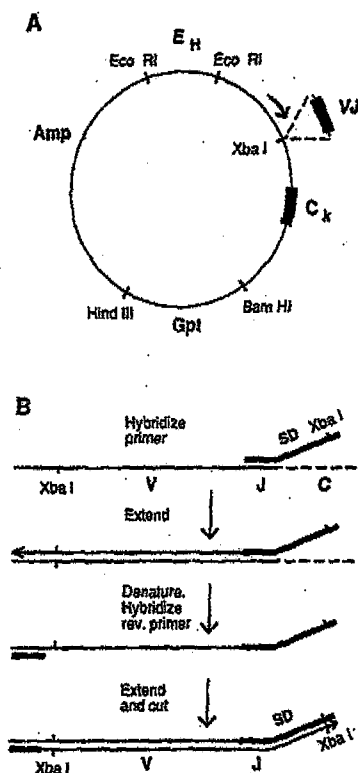


FIG. 1. (A) Schematic diagram of the plasmids pV κ 1 and pLTac. Light chain exons are shown as boxes. An arrow indicates the direction of transcription from the κ promoter. E_H, heavy chain enhancer. Not drawn to scale. (B) Schematic diagram of the method used to excise the V-J region. SD, splice donor sequence; rev. primer, reverse primer.

mid pSV2gpt (28) containing the *amp* and *gpt* genes; an 1800-bp *EcoRI*-*Bgl* II fragment from pKcatH (29) containing the heavy chain enhancer and κ promoter; and a 1500-bp *EcoRI*-*Xba* I fragment containing the human C κ region (30). Similarly, pV λ 1 was constructed starting from a 4850-bp *Bam*HI-*EcoRI* fragment of the plasmid pSV2hph (a gift of A. Smith, A. Miyajima, and D. Strehlow, Stanford University), which is analogous to pSV2gpt except that the *gpt* gene is replaced by the *hyg* gene (31). This fragment was combined with the *EcoRI*-*Bgl* II fragment from pKcatH and a 2800-bp *Hind*III-*Pvu* II fragment containing the human γ 1 constant region, isolated from a phage kindly provided by L. Hood (32). In each case, the fragments were combined by standard methods (ref. 33, pp. 390-401), with an *Xba* I linker inserted between the κ promoter fragment and the 5' end of the C region fragment.

Construction of Chimeric Genes. *EcoRI* fragments containing the anti-Tac light and heavy chain cDNAs were separately inserted into the *EcoRI* site of the phage M13mp11D, a variant of M13mp11 (34) in which the *EcoRI* and *Xba* I sites of the polylinker were filled in and joined. The resulting phage, in which the 5' ends of the cDNAs abutted the *Xba* I site, were respectively denoted M13L and M13H. The V-J (J, joining) segments of the cDNAs, followed by splice donor signals, were precisely excised from these phage, using a double-priming scheme (Fig. 1B). For the light chain, the following primer was synthesized (Applied Biosystems model 380B DNA synthesizer) and purified by gel electrophoresis: 5'-CCAGAATTCTAGAAAAGTGTACTTAC-GTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC-3'. From the 3' end, the first 22 residues of the primer are the same as the last 22 residues of the J_κ5 segment (noncoding strand). The next 16 nucleotides are the same as the sequence that follows J_κ5 in

mouse genomic DNA and therefore includes a splice donor signal. The final 10 nucleotides of the oligonucleotide include an *Xba* I site.

We hybridized this oligonucleotide to M13L and extended it with the Klenow fragment of DNA polymerase. The DNA was heat-denatured, hybridized with an excess of the "reverse primer" 5'-AACAGCTATGACCATG-3', again extended with Klenow DNA polymerase, and digested with *Xba* I. The digested DNA was run on a gel, and an approximately 400-bp fragment was excised and inserted into the *Xba* I site of pV κ 1. Sequencing showed that the fragment consisted of the V-J region of the light chain cDNA followed by the splice donor "tail," as expected (Fig. 1B), and pLTac, a clone with the appropriate orientation, was chosen. In an analogous fashion, the heavy chain V-J segment, followed by the mouse J_H2 splice donor sequence, was excised from M13H and inserted into the *Xba* I site of pV λ 1 to yield pGTac.

Computer Analysis. Sequences were manipulated and homology searches were performed with the MicroGenie Sequence Analysis Software (Beckman). The molecular model of the anti-Tac V region was constructed with the ENCAD program (35) and examined with the MIDAS program (36) on an IRIS 4D-120 graphics workstation (Silicon Graphics).

Construction of Genes for Humanized Antibody. Nucleotide sequences were selected that encoded the protein sequences of the humanized light and heavy chain V regions including signal peptides (*Results*), generally utilizing codons found in the mouse anti-Tac sequence. These nucleotide sequences also included the same splice donor signals used in the chimeric genes and an *Xba* I site at each end. For the heavy chain V region, four overlapping 120- to 130-nucleotide-long oligonucleotides were synthesized that encompassed the entire sequence on alternating strands. The oligonucleotides were phosphorylated with polynucleotide kinase, annealed, extended with T4 DNA polymerase, cut with *Xba* I, and ligated into the *Xba* I site of pUC19 (34), using standard reaction conditions. An insert with the correct sequence was recloned in pV λ 1. The humanized light chain V region was constructed similarly.

Transfections. For each antibody constructed, the light chain plasmid was first transfected into Sp2/0 mouse myeloma cells (ATTC CRL 1581) by electroporation (Bio-Rad Gene Pulser) and cells were selected for *gpt* expression (28). Clones secreting a maximal amount of light chain, as determined by ELISA, were transfected with the heavy chain plasmid and cells were selected for hygromycin B resistance (31). Clones secreting a maximal amount of complete antibody were detected by ELISA. The clones were used for preparation of chimeric and humanized antibodies.

Antibody Purification. Medium from confluent cells was passed over a column of staphylococcal protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia), and antibody was eluted with 3 M MgCl₂. Antibody was further purified by ion-exchange chromatography on BakerBond ABx (J. T. Baker). Final antibody concentration was determined, assuming that 1 mg/ml has an A₂₈₀ of 1.4. Anti-Tac antibody itself was purified as described (2).

Affinity Measurements. Affinities were determined by competition binding. HuT-102 human T-lymphoma cells (ATTC TIB 162) were used as source of p55 Tac antigen. Increasing amounts of competitor antibody (anti-Tac, chimeric, or humanized) were added to 1.5 ng of radioiodinated (Pierce Iodo-Beads) tracer anti-Tac antibody (2 μ Ci/ μ g; 1 Ci = 37 GBq) and incubated with 4×10^5 HuT cells in 0.2 ml of binding buffer (RPMI 1040 medium with 10% fetal calf serum, human IgG at 100 μ g/ml, 0.1% sodium azide) for 3 hr at room temperature. Cells were washed and pelleted, and their radioactivities were measured, and the concentrations of bound and free tracer antibody were calculated. The affinity of mouse anti-Tac was determined by Scatchard plot analy-

sis, using anti-Tac itself as the competitor. Then the affinities of the chimeric and humanized antibodies were each calculated according to the formula $[X] - [\text{anti-Tac}] = (1/K_x) - (1/K_a)$, where K_a is the affinity of anti-Tac ($9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$), K_x is the affinity of the competitor X, [] indicates the concentration of competitor antibody at which bound/free tracer binding is $R_0/2$, and R_0 is maximal bound/free tracer binding (37).

RESULTS

Cloning of Light and Heavy Chain cDNA. A cDNA library in λ gt10 was prepared from anti-Tac hybridoma cells and screened with oligonucleotide probes for the mouse κ and γ 2a constant regions. The cDNA inserts from four κ -positive and four γ 2a-positive phage were subcloned in M13mp19. Partial sequencing showed that two of the κ isolates had one sequence, and the other two had another sequence. In one pair, a V_{κ} gene segment was joined to the $J_{\kappa}2$ segment out of its reading frame. In addition, the conserved cysteine at position 23 was absent from this V segment, and the sequences of the two isolates differed slightly. Presumably, the clones were the result of an aberrant joining event in one κ allele, which continued to undergo somatic mutation after the formation of the hybridoma.

The V-J segments of the other pair of κ clones were sequenced completely and were identical. This light chain uses the $J_{\kappa}5$ segment. Partial sequencing of the four γ 2a clones showed they were all from the same gene. The V-J segments of two were sequenced completely and were identical. This heavy chain uses the $J_{H}2$ segment and is of subgroup II (38). The DNA sequences have been deposited with GenBank; the deduced protein sequences are shown in Fig. 2. As both alleles of the κ light chain were accounted for and only one heavy chain sequence was detected, we tentatively assigned these sequences to the anti-Tac antibody genes.

Construction of Chimeric Genes. Plasmid vectors were prepared for the construction and expression of chimeric light and heavy chain genes. The plasmid pV κ 1 (Fig. 1A) contains the human genomic C_{κ} segment, including 336 bp of the preceding intron and the poly(A) signal. It also contains the promoter sequence from the MOPC 41 κ gene and the heavy chain enhancer sequence, which synergize to form a very strong transcriptional unit (29). There is a unique *Xba* I site between the promoter and the intron. A similar plasmid, pV γ 1, was prepared by using the human $C_{\gamma}1$ region in place of the C_{κ} region. In that case, the region inserted between the *Xba* I and *Bam*HI sites extended from about 210 bp 5' of the $C_{H}1$ exon to beyond the $C_{H}3$ exon.

Our strategy was to insert the V-J region from the anti-Tac cDNA, followed by a splice donor signal, at the *Xba* I site

of pV κ 1 to construct the plasmid pLTac. Doing so created a chimeric κ gene with a short synthetic intron between the mouse V-J and human C_{κ} segments (Fig. 1A). For this purpose, we used a form of double primer-directed mutagenesis (Materials and Methods; Fig. 1B). Similarly, the V-J region from the anti-Tac γ 2a heavy chain cDNA, followed by a splice donor signal, was inserted into the *Xba* I site of pV γ 1. The resulting plasmid, pGTac, contained a chimeric heavy chain gene, with a synthetic intron between the mouse V-J and human $C_{\gamma}1$ segments.

Construction of a Humanized Anti-Tac Antibody. In selecting a human antibody to provide the variable region framework for the humanized anti-Tac antibody, we reasoned that the more homologous the human antibody was to the original anti-Tac antibody, the less likely would combining the anti-Tac CDRs with the human framework be to introduce distortions into the CDRs. The anti-Tac heavy chain sequence was therefore compared by computer with all the human heavy chain sequences in the National Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource (release 15). The heavy chain V region of the Eu antibody (of human heavy chain subgroup I; ref. 38) was 57% identical to the anti-Tac heavy chain V region (Fig. 2B); all other complete V_H regions in the data bank were 30–52% identical. However, no one human light chain V region was especially homologous to the anti-Tac light chain. We therefore chose to use the Eu light chain (of human light chain subgroup I; ref. 38) together with the Eu heavy chain to supply the framework sequences for the humanized antibody. The CDRs in the humanized antibody were of course chosen to be identical to the anti-Tac CDRs (Fig. 2).

A computer program was used to construct a plausible molecular model of the anti-Tac V domain (Fig. 3), based on homology to other antibody V domains with known crystal structure and on energy minimization. Graphic manipulation shows that a number of amino acid residues outside of the CDRs are in fact close enough to them to either influence their conformation or interact directly with antigen. When these residues differ between the anti-Tac and Eu antibodies, the residue in the humanized antibody was chosen to be the anti-Tac residue rather than the Eu residue. This choice was made for residues 27, 30, 48, 67, 68, 98, and 106 in the humanized heavy chain, and for 47 and 59 in the humanized light chain (Figs. 2 and 3; amino acids shown in blue in Fig. 3), although we now consider the light chain residue 59, which was chosen on the basis of an earlier model, to be doubtful. In this way, we hoped to better preserve the precise structure of the CDRs at the cost of possibly making the humanized antibody slightly less "human."

Different human light or heavy chain V regions exhibit strong amino acid homology outside of the CDRs, within the framework regions. However, a given V region will usually

A	B
1 DIQHTQSPSTLSASVGDRT	1 QVQLVQSGAEVKKFGSSVKV
2 QIVLTQSPAINASAPGERVT	2 QVQLQSGAEALAKFGASVKN
21 ITCRASQSINTULANYQQKF	21 SCKASGGTFSRSATIVVQA
22 ITCSASSSLSYMHWFQKKF	22 SCKASGCTFTSYRHHVVKQR
41 GKAPKLLHYKASSLESQVFS	41 PGQGLEWNGGIVPHFGPPNY
40 GTSFKLWIVTTSNLASGVPA	41 PGQGLEWVGVINPSTGYTRY
61 RFIGSGSGTEFTLTISLQPF	61 AQKFQGRVITADESTNTAY
60 RFEGSGSGTSYSLTISRMEA	61 NQKFKDKATLTADKSSSTAY
81 DDFATZYQCQYNSSDKNFGQ	81 MELSSLRSEDTAFYFCAGGY
80 EDAATZYCHORSTYPLTFS	81 NQLSSLTFFDSAVYVCAGE
101 GTKVEVK	101 GIYSPEEYNGGLVTVSS
100 TKLELK	100 GGVFDYHGQGTTLTVSS

FIG. 2. Amino acid sequences of the humanized anti-Tac light (A) and heavy (B) chains. The sequences of the Eu antibody light and heavy chains (upper lines) are shown aligned above the mouse anti-Tac light and heavy chain sequences (lower lines), with a | indicating identity of amino acids. The three CDRs in each chain are underlined, and the other mouse amino acids used in the humanized antibody are double underlined. Hence, the humanized sequences are the same as the upper (Eu) sequences, except where the amino acid is underlined or double underlined.

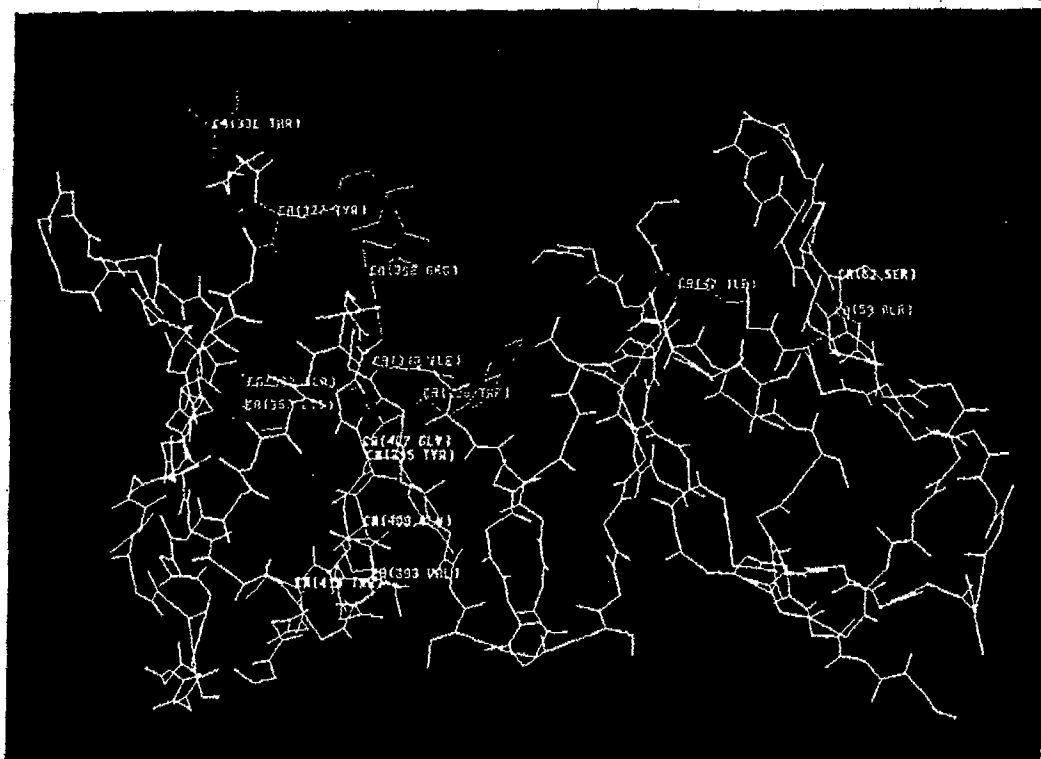


FIG. 3. Model of the mouse anti-Tac antibody V region, generated with the ENCAD program and displayed with the MIDAS program. Amino acids in the CDRs are shown in red; amino acids potentially interacting with the CDRs are shown in blue; other mouse amino acids used in the humanized antibody are shown in yellow, as described in the text. Thus, all amino acids transferred from the anti-Tac sequence to the humanized antibody are shown in red, blue, or yellow. Residue 1 is the first amino acid of V_H ; residue 301 is the first amino acid of V_L .

contain exceptional amino acids, atypical of other human V regions, at several framework positions. The Eu antibody contains such unusual residues at positions corresponding to 93, 95, 98, 106, 107, 108, and 110 of the humanized heavy chain and 47 and 62 of the light chain (Fig. 2), as determined by visual comparison of the Eu heavy and light chain V regions with other human V regions of subgroup I (38). The Eu antibody contains several other unusual residues, but at the listed positions, the murine anti-Tac antibody actually has a residue much more typical of human sequences than does Eu. At these positions, we therefore chose to use the anti-Tac residue rather than the Eu residue in the humanized antibody, to make the antibody more generically human. Some of these residues had already been selected because of their proximity to the CDRs, as described above (the remaining ones are shown in yellow in Fig. 3).

These criteria allowed the selection of all amino acids in the humanized antibody V regions as coming from either anti-Tac or Eu (Fig. 2). DNA segments encoding the desired heavy and light chain amino acid sequences were synthesized. These DNA segments also encoded typical immunoglobulin signal sequences for processing and secretion, and they contained splice donor signals at their 3' end. The light and heavy chain segments were cloned, respectively, in pV κ 1 and pV λ 1 to form the plasmids pHuLTac and pHuGTac.

Properties of Chimeric and Humanized Antibodies. Sp2/0 cells, a nonproducing mouse myeloma line, were transfected sequentially with pLTac and pGTac (chimeric genes) or with pHuLTac and pHuGTac (humanized genes). Cell clones were selected first for antibiotic resistance and then for maximal antibody secretion, which reached $3 \mu\text{g}/10^6$ cells per 24 hr. S1 nuclease mapping of RNA extracted from the cells transfected with pLTac and pGTac showed that the synthetic introns between the V and C regions (Fig. 1A) were correctly spliced (data not shown). Antibody was purified from the

culture medium of cells producing the chimeric or humanized antibody. When analyzed by reducing SDS/polyacrylamide gel electrophoresis, the antibodies showed only two bands, having the expected molecular weights 50,000 and 25,000.

Flow cytometry showed that the chimeric and humanized antibodies bound to Hut-102 and CRIL2 cells, two human T-cell lines that express the p55 chain of the IL-2R, but not to CEM and other cell lines that do not express the IL-2R. To determine the binding affinity of the chimeric and humanized antibodies, their ability to compete with labeled mouse anti-Tac for binding to Hut-102 cells was determined. The affinity of chimeric anti-Tac was indistinguishable from that of anti-Tac (data not shown), as expected from the fact that their entire V regions are identical. The affinity of humanized anti-Tac for membrane-bound p55 was $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, about 1/3 the measured affinity of $9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ of anti-Tac itself (Fig. 4).

DISCUSSION

Because monoclonal antibodies can be produced that are highly specific for a wide variety of cellular targets, antibody therapy holds great promise for the treatment of cancer, autoimmune conditions, and other diseases. However, this promise has not been widely realized, largely because most monoclonal antibodies, which are of mouse origin, are immunogenic when used in human patients and are ineffective at recruiting human immune effector functions such as CDC and ADCC. A partial solution to this problem is the use of chimeric antibodies (16), which combine the V region binding domains of mouse antibodies with human antibody C regions. Initially, chimeric antibodies were constructed by combining genomic clones of the V and C region genes. However, this method is very time consuming because of the difficulty of genomic cloning, especially from tetraploid hybridoma

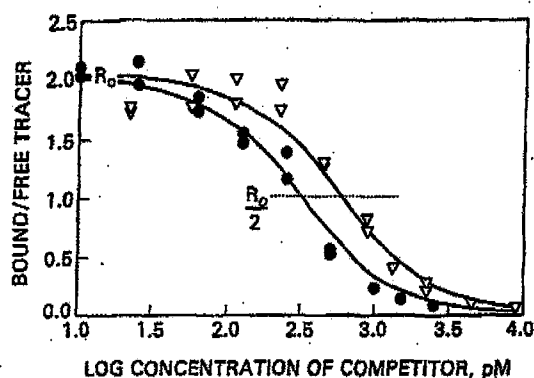


FIG. 4. Competitive binding of labeled anti-Tac tracer to Hut-102 cells. Duplicate samples are shown. •, Mouse anti-Tac competitor; ∇ , humanized anti-Tac competitor.

More recently, cDNA clones of the V and C regions have been combined, but this method is also tedious because of the need to join the V and C regions precisely (20, 21). Here we show that the V region from a readily obtainable cDNA clone can be easily joined to a human genomic C region, which need only be cloned once, by leaving a synthetic intron between the V and C regions. When linked to suitable transcriptional regulatory elements and transfected into an appropriate host cell, such chimeric genes produce antibody at a high level.

Chimeric antibodies represent an improvement over mouse antibodies for use in human patients, because they are presumably less immunogenic and sometimes mediate CDC or ADCC more effectively (21). For example, chimeric anti-Tac mediates ADCC with activated human effector cells, whereas murine anti-Tac does not (unpublished data). However, the mouse V region can itself be highly immunogenic (15). Winter and colleagues therefore took the further, innovative, step of combining the CDRs from a mouse (or rat) antibody with the framework region from a human antibody (22–25), thus reducing the xenogeneic elements in the humanized antibody to a minimum. Unfortunately, in some cases the humanized antibody had significantly less binding affinity for antigen than did the original mouse antibody. This is not surprising, because transferring the mouse CDRs from mouse framework to the human framework could easily distort them.

In humanizing the anti-Tac antibody, which binds to the α chain of the human IL-2R, we have introduced two ideas that may have wider applicability. First, the human framework was chosen to be as homologous as possible to the original mouse antibody to reduce any deformation of the mouse CDRs. Second, computer modeling was used to identify several framework amino acids in the mouse antibody that might interact with the CDRs or directly with antigen, and these amino acids were transferred to the human framework along with the CDRs. The resulting humanized antibody has a high affinity, $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, for its antigen. Further work is needed to determine to what extent the choice of human framework and the preservation of particular mouse amino acids in fact contributed to the affinity of the humanized antibody. The extent to which humanization eliminates immunogenicity will need to be addressed in clinical trials, where humanized anti-Tac will be administered to patients with Tac-expressing lymphomas or selected autoimmune diseases or to patients receiving organ transplants.

3. Leonard, W. J., Depper, J. M., Uchiyama, T., Smith, K. A., Waldmann, T. A. & Greene, W. C. (1982) *Nature (London)* 300, 267–269.
4. Tsuda, M., Kozak, R. W., Goldman, C. K. & Waldmann, T. A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9694–9698.
5. Sharon, M., Klausner, R. D., Cullen, B. R., Chizzonite, R. & Leonard, W. J. (1986) *Science* 234, 859–863.
6. Depper, J. M., Leonard, W. J., Robb, R. J., Waldmann, T. A. & Greene, W. C. (1983) *J. Immunol.* 131, 690–696.
7. Kirkman, R. L., Barrett, L. V., Gaulton, G. N., Kelley, V. E., Ythier, A. & Strom, T. B. (1985) *J. Exp. Med.* 162, 358–362.
8. Kupiec-Weglinski, J. W., Diamantstein, T., Tilney, N. L. & Strom, T. B. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2624–2627.
9. Volk, H.-D., Brocke, S., Osawa, H. & Diamantstein, T. (1986) *Clin. Exp. Immunol.* 66, 126–131.
10. Kelley, V. E., Gaulton, G. N., Hattori, M., Ikegami, H., Eisenbarth, G. & Strom, T. B. (1988) *J. Immunol.* 140, 59–61.
11. Reed, M. H., Shapiro, M. E., Strom, T. B., Milford, E. L., Carpenter, C. B., Weinberg, D. S., Reimann, K. A., Letvin, N. L., Waldmann, T. A. & Kirkman, R. L. (1989) *Transplantation* 47, 55–59.
12. Ortho Multicenter Transplant Study Group (1985) *N. Engl. J. Med.* 313, 337–342.
13. Kirkman, R. L., Shapiro, M. E., Carpenter, C. B., Milford, E. L., Ramos, E. L., Tilney, N. L., Waldmann, T. A., Zimmerman, C. E. & Strom, T. B. (1989) *Transplant. Proc.* 21, 1766–1768.
14. Waldmann, T. A., Goldman, C. K., Bongiovanni, K. F., Sharrow, S. O., Davey, M. P., Cease, K. B., Greenberg, S. J. & Longo, D. L. (1988) *Blood* 72, 1805–1816.
15. Jaffers, G. J., Fuller, T. C., Cosimi, A. B., Russell, P. S., Wian, H. J. & Colvin, R. B. (1986) *Transplantation* 41, 572–578.
16. Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A. & Oi, V. T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851–6855.
17. Boulianne, G. L., Hozumi, N. & Shulman, M. J. (1984) *Nature (London)* 312, 643–646.
18. Neuberger, M. S., Williams, G. T., Mitchell, E. B., Jouhal, S. S., Flanagan, J. G. & Rabbitts, T. H. (1985) *Nature (London)* 314, 268–270.
19. Sun, L. K., Curtis, P., Rakowicz-Szulczynska, E., Ghayeb, J., Chang, N., Morrison, S. L. & Koprowski, H. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 214–218.
20. Whittle, N., Adair, J., Lloyd, C., Jenkins, L., Devine, J., Schlom, J., Raubitschek, A., Colcher, D. & Bodmer, M. (1987) *Protein Eng.* 1, 499–505.
21. Liu, A. Y., Robinson, R. R., Hellstrom, K. E., Murray, E. D., Jr., Chang, C. P. & Hellstrom, I. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3439–3443.
22. Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. & Winter, G. (1986) *Nature (London)* 321, 522–525.
23. Verhoeven, M., Milstein, C. & Winter, G. (1988) *Science* 239, 1534–1536.
24. Reichmann, L., Clark, M., Waldmann, H. & Winter, G. (1988) *Nature (London)* 332, 323–327.
25. Hale, G., Dyer, M. J. S., Clark, M. R., Phillips, J. M., Marcus, R., Reichmann, L., Winter, G. & Waldmann, H. (1988) *Lancet* i, 1394–1399.
26. Gubler, U. & Hoffman, B. J. (1983) *Gene* 25, 263–269.
27. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.
28. Mulligan, R. C. & Berg, P. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2072–2076.
29. Garcia, J. V., Bich-Thuy, L. T., Stafford, J. & Queen, C. (1986) *Nature (London)* 322, 383–385.
30. Hieter, P. A., Max, E. E., Seidman, J. G., Maizel, J. V., Jr., & Leder, P. (1980) *Cell* 22, 197–207.
31. Sugden, B., Marsh, K. & Yates, J. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5, 410–413.
32. Ellison, J.-W., Berson, B. J. & Hood, L. E. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 4071–4079.
33. Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY).
34. Yarnisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) *Gene* 33, 103–119.
35. Levitt, M. (1983) *J. Mol. Biol.* 168, 595–617.
36. Ferrin, T. E., Huang, C. C., Jarvis, L. E. & Langridge, R. (1988) *J. Mol. Graphics* 6, 13–27.
37. Berzofsky, J. A. & Berkower, I. J. (1984) in *Fundamental Immunology*, ed. Paul W. E. (Raven, New York), pp. 595–644.
38. Kabat, E. A., Wu, T. T., Reid-Miller, M., Perry, H. M. & Gottesman, K. S. (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

1. Waldmann, T. A. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58, 875–911.
2. Uchiyama, T., Broder, S. & Waldmann, T. A. (1981) *J. Immunol.* 126, 1393–1397.

201
202

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 28,117
FECHA : ABRIL 7 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-041969-00007-0000

Fecha: 2008-04-15 16:55:30 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 21

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	2677847	07/04/2008	50,753,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	103,000.00
		TOTAL :	\$ 103,000.00

SON: CIENTO TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo 13115-841-002-0

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

Radicación No. 04-41969
Clasificación Internacional (IPC): C07K 16/00
Concepto Técnico No. 2447

Patente de Invención ☒ Patente de Modelo de Utilidad ☐
Vía Nacional ☐
Vía PCT (fase nacional) ☒ Cap. I ☐ Cap. II ☒

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

1. Documentos estudiados

<u>Descripción:</u>	Folios: 51 a 89	como se radicó inicialmente
<u>Reivindicaciones:</u>	Folios 90 a 95 Folios 190 a 192	como se radicó inicialmente como se modificó el 25/02/2008
<u>Figuras:</u>	Folios 97 a 120	como se radicó inicialmente
<u>Prioridad:</u>	Folio: 1 Fecha: 10/10/2001 País: GB Número: 0214317.9	
<u>Respuesta del solicitante:</u>	Folios: 179 a 188	Tal como se radicó el 25/02/2008

2. Modificaciones (artículo 34 D.486 y art. 22 Tratado PCT)

Se aceptan las modificaciones realizadas por el solicitante toda vez que no amplían el objeto inicial de la solicitud.

3. Objeto de la invención

- Título de la solicitud (folio 65): "Moléculas De anticuerpo con especificidad para KDR para prevenir la interacción entre VEGF y KDR, y el uso y método para la producción de las mismas".
- El anterior procedimiento busca desarrollar un anticuerpo que tiene especificidad para el KDR humano, un vector donde se exprese, una célula anfitriona, el proceso para su producción y una composición de diagnóstico que comprenda dicha molécula.
- El problema planteado por la presente solicitud es la necesidad de moléculas de anticuerpo que se unan al KDR con mayor afinidad que con el factor de crecimiento endotelial vascular humano VEGF, y prevenir la interacción que ocurre entre el VEGF y el KDR.
- Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio presenta una secuencia de cadena liviana y una secuencia de cadena pesada con las regiones variables correspondientes que poseen especificidad por el KDR humano. Así mismo se presenta la molécula de anticuerpo completa definida por sus secuencias, los fragmentos Fab y derivados, el vector de expresión de la molécula, la célula anfitriona transformada con dicho vector, el proceso de producción de la molécula de anticuerpo, la composición de diagnóstico y el compuesto de anticuerpo PEGilado.
- La Clasificación Internacional de Patentes (IPC) para esta solicitud es C12N15/05.

4. De la solicitud de Patente

Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

Realizadas las modificaciones al capítulo reivindicatorio, este define, es claro y conciso y además está lo suficientemente sustentado por la descripción. Por lo anterior, las reivindicaciones sí cumplen con el art. 30 de la Decisión 486.

5. Determinación del Estado de la Técnica

- La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el estado de la técnica es: 10/10/2001
- Consultadas las bases de datos con que cuenta la oficina y las otras fuentes utilizadas para determinar el estado de la técnica y habiéndose subsanado las objeciones realizadas en el anterior concepto técnico 2314, no se encontró documento alguno que afecte el objeto de la solicitud.

6. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

6.1. Nivel Inventivo (artículo 18 D486)

Las reivindicaciones estudiadas corresponden del numeral 1 a 26 contenida en los folios 190 a 192

Aunque los documentos citados en los anteriores requerimientos intentan resolver el problema técnico planteado inicialmente en la solicitud, se aceptan los argumentos del solicitante en la medida en que la invención de la solicitud define específicamente la solución en un anticuerpo con la secuencia de aminoácidos inequívoca que reconoce y tiene especificidad por el KDR humano. El anticuerpo en cuestión no había sido definido secuencialmente, ni se habían determinado las regiones CDR de las cadenas pesada y liviana, para que pudieran ser expresadas en un organismo, gracias a un vector y de esta forma producirlas para ser incluidas en un compuesto de uso terapéutico.

Por consiguiente se concluye que la presente solicitud tiene nivel inventivo de acuerdo a lo estipulado en el art. 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

6.2. Aplicación industrial (artículo 19 D 486)

Las reivindicaciones estudiadas corresponden de la número 1 a la 26 contenida en los folios 190 a 192

La presente invención sí tiene Aplicación Industrial ya que su objeto puede ser aplicado en la industria de farmacéuticos

7. **Conclusión**

En consecuencia y por todo lo expuesto anteriormente, se recomienda **Conceder** las reivindicaciones: 1 a 26 (folios: 190 a 192) con el título modificado **“Moléculas De anticuerpo con especificidad por el KDR para prevenir la interacción entre VEGF y KDR, y método para la producción de las mismas”**.

Bogotá, D.C.,

CONCEPTO TECNICO No. 2448	EXAMINADOR TECNICO Código No. 202089
-------------------------------------	--

0293



AVISO DE NOTIFICACION
CORREO CERTIFICADO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Radicación : 4-41969- -9-0 Fecha: 2009-09-01 08:22:30
Trámite : 11 PATENTEII
Evento : 379 FASENACIONALII
Actuación : 432 COMUNICACTOADM
Destinatario : EMILIO FERRERO Folios 1

Señor (a) (es)
EMILIO FERRERO
CARRERA 4 NO. 72 - 35
BOGOTA D.C.

Referencia RESOLUCION : 44327
Fecha : 31/08/2009
Expediente : 4-41969
Trámite : 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II
Evento : 379 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II
Actuación : 432 COMUNICACION ACTO ADMINISTRATIVO

Comedidamente le solicito presentarse a este Despacho ubicado en la Carrera 13 No. 27 - 00 Piso Quinto (5), de la ciudad de Bogotá D.C., dentro del término de cinco (5) días hábiles contados a partir del envío de la presente citación, en horario de 8:00 a.m. a 4:30 p.m. jornada continua, con el fin de notificarle personalmente el contenido de la resolución de la referencia proferida dentro del expediente tramitado con el número de radicación citado en el asunto.

De no hacerse presente en el término indicado anteriormente, la providencia en mención se notificará por edicto, el cual se fijará por el término de diez (10) días en el Centro de Documentación e Información.

Para su comodidad el texto completo de la resolución se encontrará disponible en la página web de la Entidad desde el día hábil siguiente al de su notificación, la cual podrá ser consultada desde un computador con acceso a Internet, en la página www.sic.gov.co, con el número de resolución a través de la opción servicios en línea bases de datos - otros servicios - consulta actos administrativos.

En caso de que se haya notificado, haga caso omiso de este aviso.

Secretaría General
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Al contestar favor indique el número de radicación consignado en el sticker

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26- 55 int. 2 Tel 5880070
Call Center 6513240 . Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION **Nº 4 4 3 2 7**

Por la cual se otorga una patente de invención

CERTIFICADO **352**

Rad. PCT/ 04-41969

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

en ejercicio de sus facultades legales, en especial de las que se confirieron en el artículo 4, numeral 5 del decreto 2153 de 1992, y

CONSIDERANDO:

PRIMERO: Que la solicitud de patente de invención titulada "MOLECULAS DE ANTICUERPO CON ESPECIFICIDAD PARA RDQ PARA PREVENIR LA INTERACCION ENTRE FCVE Y RDQ, Y EL USO Y METODO PARA LA PRODUCCION DE LAS MISMAS", que corresponde a la solicitud internacional PCT/GB 02/04619 de fecha 10 de octubre del 2002, fue radicada en esta Superintendencia el 06 de mayo del 2004 bajo el número 04041969, para que se dé comienzo a la fase nacional en virtud del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT).

SEGUNDO: Que el extracto de esta solicitud fue publicado en la Gaceta de la Propiedad Industrial Nº 558 del 30 de noviembre del 2005, sin que se hubieran presentado oposiciones por parte de terceros.

TERCERO: Que realizado el examen de fondo se requirió al solicitante en los términos del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, para que presentara respuesta a las observaciones de carácter técnico visibles a folios 172 a 178 del cuaderno administrativo, relacionadas con la patentabilidad o cumplimiento de los requisitos establecidos por esta Decisión, para la concesión de la patente.

CUARTO: Que el solicitante mediante escrito radicado bajo el número 04-041969-00007-0000 del 15 de abril del 2008, atendió oportunamente el requerimiento formulado, presentando nuevos folios 190 a 192 con el texto de las reivindicaciones que reemplazan las originalmente presentadas, atendiendo de esta manera las observaciones efectuadas en el examen de fondo. El nuevo capítulo reivindicatorio se acepta, como quiera que se ajusta a las prescripciones contenidas en el artículo 34 de la Decisión 486.

QUINTO: Que en virtud de lo dispuesto en el artículo 14 de la Decisión 486 expedida por la Comisión de La Comunidad Andina se otorgarán patentes "...para las invenciones, sean de producto o de procedimiento, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial".

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION Nº 4 4 3 2 7

Por la cual se otorga una patente de invención

CERTIFICADO 352

Rad. PCT/ 04-41969

SEXTO: Que en el presente caso cumplen los requisitos indicados en el numeral anterior las reivindicaciones 1 a 26 contenidas en los folios 190 a 192, razón por la cual este Despacho encuentra procedente conceder para la misma el privilegio de patente solicitado.

SEPTIMO: Que de acuerdo con el objeto concedido se modifica el título de la invención, el cual quedará de la siguiente manera: "MOLECULAS DE ANTICUERPO CON ESPECIFICIDAD POR EL KDR PARA PREVENIR LA INTERACCION ENTRE VEGF Y KDR, Y METODO PARA LA PRODUCCION DE LAS MISMAS".

RESUELVE:

ARTICULO PRIMERO: Otorgar el privilegio de patente de invención a la solicitud que entró en fase nacional en virtud del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), para la creación denominada:

**" MOLECULAS DE ANTICUERPO CON ESPECIFICIDAD POR EL KDR PARA
PREVENIR LA INTERACCION ENTRE VEGF Y KDR, Y METODO PARA LA
PRODUCCION DE LAS MISMAS "**

Clasificación IPC: C 07 K 16/00.

Reivindicación(es): 1 a 26 **Folio(s):** 190 a 192

Titular(es): CELLTECH R&D LIMITED.

Domicilio(s): Berkshire, Reino Unido.

Inventor(es): George Andrew Popplewell, Peter Simon Tickle, Karen Zinkewich-Peotti y Kendall Robert Morrison.

Prioridad Nº: 0124317.9 **Fecha:** 10 de octubre del 2001 **País:** GB.

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION **Nº 4 4 3 2 7,**

Por la cual se otorga una patente de invención

CERTIFICADO **352**

Rad. PCT/ 04-41969

Solicitud Internacional Nº: PCT/GB 02/04619 Fecha: 10 de octubre del 2002.

Vigente desde: 10 de octubre del 2002 Hasta: 10 de octubre del 2022

ARTICULO SEGUNDO: El titular tendrá los derechos y las obligaciones establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina y demás disposiciones legales vigentes sobre propiedad industrial, precisando que para mantener vigente la patente se deberá cancelar la tasa anual de mantenimiento conforme lo dispone el artículo 80 de la referida norma comunitaria.

ARTICULO TERCERO: Entregar al titular copia auténtica de esta resolución y el certificado de patente, previas las anotaciones en los libros de registro.

ARTICULO CUARTO: Notificar el contenido de la presente resolución al doctor Emilio Ferrero, en su calidad de apoderado de Celltech R&D Limited., o a quien haga sus veces, entregándole copia de la misma, advirtiéndole que contra ella procede el recurso de reposición ante el Superintendente de Industria y Comercio, del cual podrá hacer uso al momento de la notificación personal o dentro de los 5 días hábiles siguientes a ella.

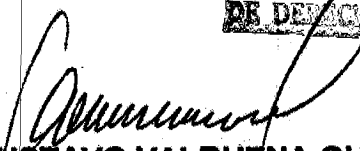
NOTIFÍQUESE Y CUMPLASE

Dada en Bogotá, D.C., a los

31 AGO. 2009

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO,

APORTE REQUERIDO POR VALOR DE
\$ 5.004 POR CONCEPTO
DE DEBERES ADMINISTRATIVOS


GUSTAVO VALBUENA QUIÑONES

Doctor
EMILIO FERRERO
Carrera 4 Nº 72 – 35, Piso 4.
Bogotá D.C.

202021

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 Conmutador: 5870000
Fax: 5870284. Línea 0180000-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

209
2P

Superintendencia de Industria y Comercio

Otorga la Patente de Invención a:

Celltech R&D Limited
, Reino Unido de La Gran Bretaña

A la Creación denominada:

"Moléculas de anticuerpo con especificidad por el kdr para prevenir la interacción entre vegf y kdr, y método para la producción de las mismas"

Inventor(es):

George Andrew Popplewell

Peter Simon Tickle

Karen Pinkewinch-Scotti

Kendall Robert Morrison

Certificado No. 352

Solicitud Internacional No. GB02/04619

Clasificación Internacional:
de Patentes C7K 16/0

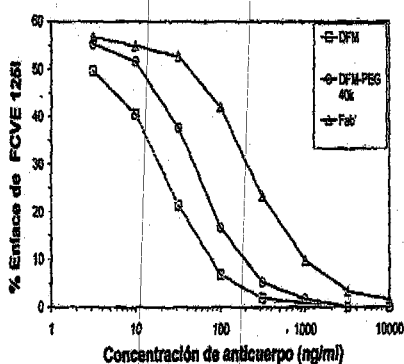
Prioridad No. GB 0124317.9 10/10/2001

26 Reivindicaciones

Vigente Desde: 10/10/2002

Hasta: 10/10/2022

BLOQUEO DE LA UNIÓN 125I FCVE AL IgFC HUMANO DE RDQ



Que la solicitud de Patente de Invención No 4 41969 cumple con los requisitos previstos en las disposiciones legales vigentes, Resolución No. 44327 de 31/08/2009, en testimonio de ello se estampa la firma del funcionario competente y el sello de esta Entidad.

Superintendente de Industria y Comercio