

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCI

Fecha: 2009-07-22 17:23:21 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 12

SOLICITUD DE:

1

☐

Corrección de Error Material.

☒

Modificación a una Solicitud.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: BAYER SCHERING PHARMA
AKTIENGESELLSCHAFT

Dirección: Müllerstrasse 178, 13353 Berlín,
Alemania

Nacionalidad o Domicilio: ALEMANA

Lugar de Constitución: ALEMANIA

Teléfono: _____ **Fax:** _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: J. IAN RAISBECK

Dirección: World Trade Center Torre A
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10. Bogotá

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.376.996 Bta
TP 135.799

4

Número de expediente:
06-034.944

5

Descripción de la corrección o modificación solicitada Me permito solicitar el
cambio de nombre del solicitante de **SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT** por el de
BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT

6

Comprobante de pago No. _____ **Fecha** _____

7

Anexos

☒

Comprobante de pago de la tasa.

☒

Poderes, si fuere el caso. Documento que soporta el cambio de nombre

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando
sean personas jurídicas.

8

NOMBRE: J. IAN RAISBECK

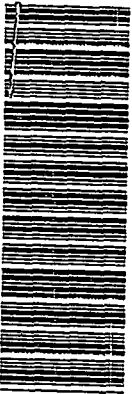
FIRMA: 

C.C. 79.376.996 Bta T.P. 135.799

CECBA - LEY 404 GCBA

LEGALIZACION

070312117346



\$20.00

12/03/2007

13:51:46

CECBA - LEY 404 GCBA

LEGALIZACION

070312054713



\$39.00

12/03/2007

13:51:54



N 007422051

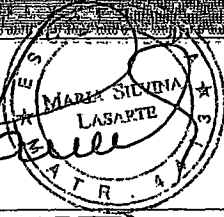
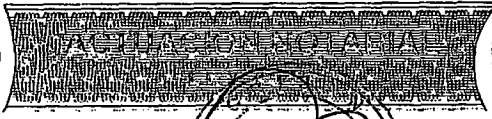
1 FOLIO 85.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: VEINTICUATRO.-
2 SUSTITUCIÓN PARCIAL DE PODER: MESSERER, Dagmar a favor de
3 OLARTE, Carlos Reinaldo y otro del Poder otorgado por BAYER SCHERING
4 PHARMA AG.- En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Capital de la República
5 Argentina, el día NUEVE de MARZO del año DOS MIL SIETE, ante mí María
6 Silvina Lasarte, Escribana Autorizante, titular del Registro Notarial número 1788,
7 COMPARECE: Dagmar MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968,
8 hija de Walter Messerer y Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Na-
9 cional de Identidad Número 20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria 27-
10 20383892-7, con domicilio especial en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º,
11 de esta Ciudad de Buenos Aires.- La compareciente es mayor de edad.- INTERVIE-
12 NE: por su propio derecho.- Y la compareciente EXPRESA: PRIMERO: Que la
13 Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con domicilio en Müllerstrasse
14 178, 13353, Berlín, Alemania, le confirió con fecha 22 de enero de 2007 en dicho pa-
15 ís, un Poder, el cual mediante escritura número 14 de fecha 16 de febrero de 2007,
16 otorgada ante la Escribana Mariela Vanina Scardaccione, al folio 44, protocolo co-
17 rriente de este Registro Notarial interinamente a su cargo, fue incorporado y transcrip-
18 to al mismo, cuya primera copia tengo para este acto a la vista, doy fe y en lo perti-
19 nente transcribiré en la presente.- SEGUNDO: Manifiesta bajo juramento que el refe-
20 rido poder se encuentra plenamente vigente en virtud de no haberle sido revocado,
21 suspendido ni limitado en ninguna de sus partes.- TERCERO: En consecuencia, DI-
22 CE: Que en uso de la facultad contenida SUSTITUYE PARCIALMENTE el poder
23 mencionado a favor de Carlos Reinaldo OLARTE y/o James Ian RAISBECK, al
24 solo y único objeto de que en nombre y representación de la Sociedad "BAYER
25 SCHERING PHARMA AG", y actuando en forma individual, indistinta y/o alterna-



N 007422051

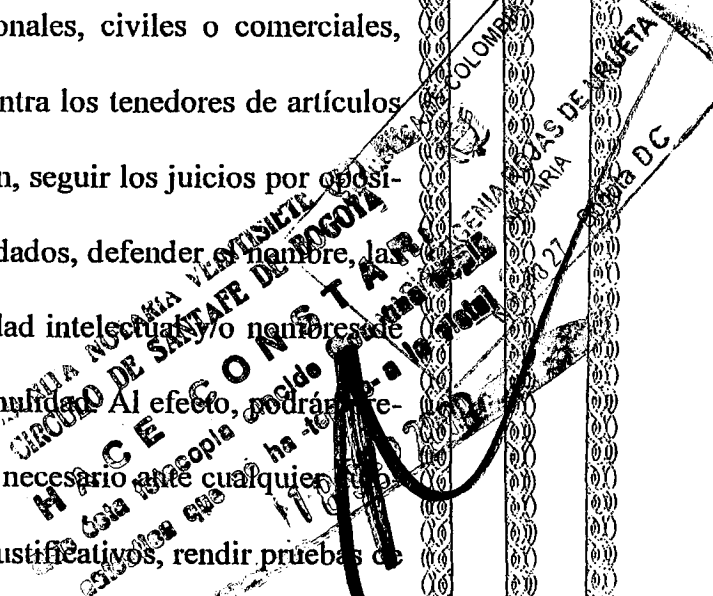
damente, se presente exclusivamente ante las autoridades de COLOMBIA que co-
rrespondan y realicen los actos enumerados en el citado poder y con las facultades que
surgen del mismo, el que transcripto en lo pertinente dice: "FOLIO 44.- PRIMERA
COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: CATORCE.- En la Ciudad Autónoma de
Buenos Aires, Capital de la República Argentina, el día DIECISÉIS de FEBRERO del
año DOS MIL SIETE, ante mí ..., Escribana Autorizante, ..., COMPARECE: Dagmar
MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968, hija de Walter Messerer y
Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Nacional de Identidad Número
20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria 27-20383892-7, domiciliada
legalmente en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad de Buenos
Aires.- La compareciente es mayor de edad.- INTERVIENE: por su propio derecho.-
Y la compareciente EXPRESA: Que a los efectos que hubiere lugar, solicita de mí, la
Autorizante, LA INCORPORACIÓN y TRANSCRIPCIÓN en este protocolo del
PODER que le fuera conferido en Berlín, Alemania, el 22 de enero de 2007, por la
Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con domicilio en Müllerstrasse 178,
13353, Berlín, Alemania, sobre cuya plena vigencia responde la requirente bajo jura-
mento.- Yo, la Autorizante, hago constar: a) Que el instrumento de poder cuya incor-
poración y transcripción a este protocolo solicita la compareciente, se encuentra ex-
tendido en idioma castellano, certificadas las firmas por notario en idioma alemán
debidamente legalizado en idioma alemán (Sello de Apostilla de la Convención de La
Haya del 5 de octubre de 1961) y traducido en lo pertinente al idioma nacional por la
Traductora Pública Laura Thieberger.- b) Que la compareciente en virtud de lo mani-
festado tiene interés legítimo en su requerimiento.- En consecuencia me he entregado
en este acto del original del instrumento de poder y relacionado con su respectiva tra-
ducción al idioma nacional, el que agrego a presente y transcripto dice: "MOE-

COLOMBIA
REPUBLICA DE COLOMBIA
EUGENIA DE URU...
NOTARIA
CIRCULO DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ
COLOMBIA
10 SEP 2007
la víctima



N 007422052

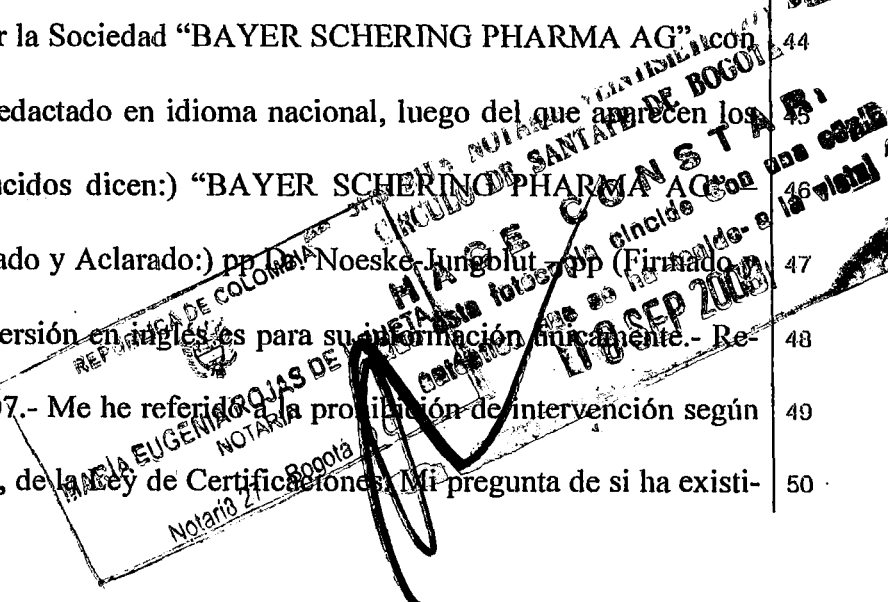
1 LLER & CO. (Sigue aclaración en idioma inglés) - PODER Los abajo firmante/s
2 BAYER SCHERING PHARMA AG domiciliados en Müllerstrasse 178 13353 Berlín
3 - Alemania declaran por el presente otorgar a Dagmar MESSERER poder general am-
4 plio y suficiente para recabar de las autoridades ..., sud y centroamericanas ... que co-
5 respondan, la obtención de patentes de invención, el registro y la renovación de mar-
6 cas y modelos y/o derechos de propiedad intelectual y/o nombres de dominio, a cuyo
7 efecto los faculta/n para llevar a cabo ante dichas autoridades todas las gestiones nece-
8 sarias al objeto indicado, presentar solicitudes, formular descripciones, oposiciones,
9 protestos, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, justificar explota-
10 ciones, solicitar testimonios, aceptar transferencias, recibir documentos y valores, per-
11 cibir y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas de cualquier
12 orden. Por otra parte, les confieren mandato para que en su nombre y representación
13 puedan iniciar y proseguir cualquier juicio que actualmente los que suscriben tengan o
14 en el futuro tuvieran ..., en Sudamérica, Centroamérica ..., con motivo de su nombre,
15 marcas de fábrica o de comercio, patentes de invención y modelos y/o de sus derechos
16 de propiedad intelectual que actualmente posean o adquieran en lo sucesivo, promover
17 juicios de cualquier jurisdicción, criminales, correccionales, civiles o comerciales,
18 contra los falsificadores, usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos
19 que infrinjan su nombre, marcas o patentes de invención, seguir los juicios por oposi-
20 ción u otros en que fueran parte como actores o demandados, defender, nombre, las
21 marcas, patentes y modelos y/o de derechos de propiedad intelectual y/o nombres de
22 dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo de nulidad. Al efecto, podrán re-
23 sentarse con escritos, querellas, pedidos, y lo que fuere necesario ante cualquier
24 ridad judicial, presentar testigos, documentos y demás justificativos, rendir pruebas de
25 cualquier especie, pedir nombramientos de peritos, pedir y absolver posiciones, asistir





N 007422052

a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar, recusar, apelar, transar, someter a arbitraje o mediación, hacer renunciaciones, exigir y dar cauciones, pedir embargos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, pedir la venta de los bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de sentencias, prestar juramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en general practicar todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este mandato. Podrán asimismo substituir el presente poder en todo o en parte.- Dado y firmado en Berlín (Sigue fecha en idioma inglés). Bayer Schering Pharma AG (Sigue texto en idioma inglés). ppa. Sigue una firma ilegible. (Aclarado:) Dr. Noeske-Jungblut. ppa. Sigue otra firma ilegible. (Aclarado:) Dr. Klose". ES COPIA FIEL, doy fe.- En hoja adjunta consta la certificación notarial de las firmas obrantes en el poder en idioma alemán, efectuada el 22 de enero de 2007 por el Escribano Dimitri Rempen, de Berlín, Alemania, y a continuación consta la respectiva legalización de la firma y sello del nombrado Notario (Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961), en idioma alemán, efectuada por el Presidente del Tribunal Regional de Berlín, Alemania.- En hojas adjuntas sigue la referida traducción al idioma nacional la que transcripta textualmente, dice: "TRADUCCIÓN PUBLICA - (Sobre papel con membrete de "MOELLER y CO" - América Latina - Agentes de la Propiedad Intelectual - figura un Poder otorgado por la Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG" con sede en Berlín, Alemania, redactado en idioma nacional, luego del que aparecen los siguientes textos, que traducidos dicen:) "BAYER SCHERING PHARMA AG Patentes y licencias - (Firmado y Aclarado:) pp. Dr. Noeske-Jungblut, pp. (Firmado y Aclarado:) Dr. Klose.- La versión en inglés es para su información únicamente.- Registro de Actas N° R 17/2007.- Me he referido a la prohibición de intervención según el artículo 3, párrafo 1, N° 7, de la Ley de Certificaciones. Mi pregunta de si ha existi-



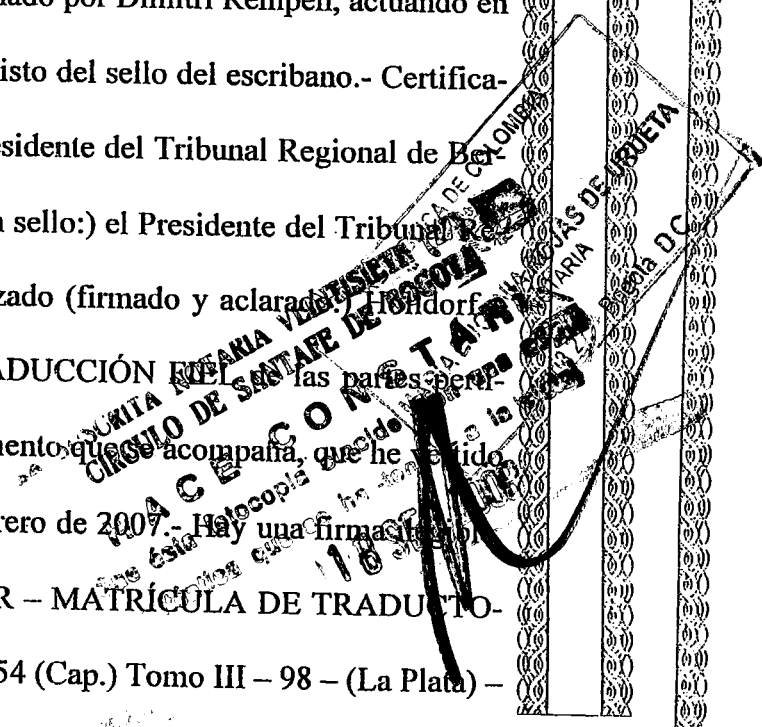


N 007422053

238

24

1 do una intervención previa en el sentido de la norma me fue contestaba por la negati-
2 va.- Las firmas trazadas ante mi por el Dr. Walter Klose, que nació el 26 de diciembre
3 de 1952, y de la Dra. Chistiane Noeske-Jungblut de soltera Noeske, que nació el 26 de
4 junio de 1957 – Ambos de mi personal conocimiento – Ambos con domicilio comer-
5 cial en 13353 Berlín, Müllerstrasse 178 son auténticas, de lo que doy fe.- Al mismo
6 tiempo certifico en base a que tuve a la vista en el día de hoy las actas del Registro de
7 Comercio del Tribunal de Primera Instancia de Charlottenburg, N° de Registro HR B
8 283, que la Sociedad “Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft”, con sede en Ber-
9 lín, está inscripta con el número mencionado arriba en el Registro de Comercio y que
10 la arriba mencionada Dra. Noeske-Jungblut y el arriba mencionado Dr. Walter Klose
11 están facultados en su carácter de mandatarios a representar en forma conjunta a la
12 Sociedad “Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft” de Berlín. Berlín, 22 de enero
13 de 2007.- El escribano (firma ilegible) y liquidación de derechos. (Hay un sello en
14 oblica sobre precinto:) Dimitri Rempen, Escribano de Berlín.- 9101ª E-F.- APOSTI-
15 LLA – (Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961) - País: República Federal
16 de Alemania - Este instrumento público fue firmado por Dimitri Rempen, actuando en
17 su carácter de escribano de Berlín, estando provisto del sello del escribano.- Certifica-
18 do en Berlín, el 24 de enero de 2007, por el Presidente del Tribunal Regional de Ber-
19 lín, con el N° 9101 a E-F 536/07 - Sello (hay un sello:) el Presidente del Tribunal Re-
20 gional de Berlín – Firma el Funcionario autorizado (firmado y aclarado) Hendorf
21 Juez Principal del Tribunal Regional.- ES TRADUCCIÓN DE las partes here-
22 ntes en los idiomas alemán e inglés del documento que se acompaña, que he leído
23 al idioma nacional, en Buenos Aires, a 6 de febrero de 2007.- Hay una firma
24 Hay un sello que dice: “LAURA THIEBERGER – MATRÍCULA DE TRADUCTO-
25 RES ALEMÁN – FRANCÉS – Tomo II Folio 254 (Cap.) Tomo III – 98 – (La Plata) –

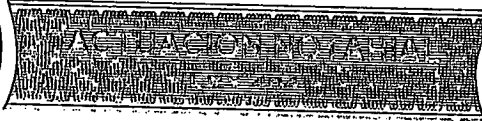




N 007422053

INGLÉS – Tomo III: Folio 14 (Cap.) – Tomo III Folio 329 (La Plata) – COLEGIO
DE TRADUCTORES PÚBLICOS Nº 173”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- A continua-
ción hay un sello que dice: “COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS DE LA
CIUDAD DE BUENOS AIRES Corresponde a la Legalización Nº T4-3278/07. Sigue
una firma ilegible: Esteban Santiago Allegretti”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- Al dorso
en el margen superior hay un sello timbrador ...”.- A continuación sigue la legaliza-
ción de la firma de la nombrada traductora, ...”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- En este
estado la compareciente DICE: que en la forma expresada deja INCORPORADO y
TRANSCRIPTO en este Protocolo el Poder que agrego a la presente, solicitando de
mí, la Escribana Autorizante, expida primera copia de la presente para la nombrada
apoderada Dagmar MESSERER.- Constancias Notariales: Identidad de la compare-
ciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se justifica la misma por conocimiento de la
Autorizante.- ...- LEO esta escritura a la compareciente, quien así la otorga y en prue-
ba de conformidad, la firma ante mí, doy fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MA-
RIELA VANINA SCARDACCIONE. Escribana. Está mi sello. CONCUERDA con
su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 44 del Registro Notarial número 1788,
interinamente a mi cargo.- PARA LA APODERADA expido la presente PRIMERA
COPIA en tres (3) sellos de actuación notarial numerados correlativamente desde el
número N 007376153 al presente inclusive, que sello y firmo en la fecha y lugar de su
otorgamiento, doy fe.- Sigue una firma ilegible y un sello que dice: Mariela Scardaccione
daccione – Escribana – Mat. 4527.”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- Las partes pertinentes de la
escritura de referencia, doy fe.- CUARTO. Finalmente la compareciente expresa a)
Que el presente otorgamiento no significa renuncia al ejercicio de las facultades sus-
tituidas; y b) Que los nombrados apoderados sustituto, no podrán sustituir el presente
poder en ninguna de sus partes.- Constancias Notariales: Identidad de la Compare-

REPUBLICA DE COLOMBIA
BOGOTÁ
EUGENIA ROJAS DE
NOTARIA
BOGOTÁ
CIRCULO NOTARIAL VENTISIETE (21)
CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTÁ
ACE CON
18 SEP 2008



N 007422054

1 ciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se justifica la misma por conocimiento de
2 la Autorizante.-Yo, la Escribana Autorizante impongo y advierto a la compareciente, a
3 tenor de lo dispuesto en el artículo 77 inciso h) de la Ley Orgánica Notarial Número
4 404, respecto de los alcances y consecuencias de las cláusulas contenidas en la presen-
5 te escritura y del derecho de leer por sí este instrumento.- LEO esta escritura a la
6 compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad la firma ante mí, doy
7 fe.- Daginar MESSERER. Ante mí: MARIA SILVINA LASARTE. Escribana. Está
8 mi sello. **CONCUERDA** con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 85 del Re-
9 gistro Notarial número 1788, a mi cargo. PARA LA PODERDANTE expido la pre-
10 sente **PRIMERA COPIA** en cuatro (4) sellos de actuación notarial numerados corre-
11 lativamente desde el número N 007422051 al presente inclusive, que sello y firmo en
12 la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.-

13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

[Handwritten signature]

[Circular stamp: MARIA SILVINA LASARTE]

[Diagonal stamp: SUSCRITA NOTARIA VEINTISIETE (27) REPUBLICA ARGENTINA]
[Diagonal stamp: CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA]
[Diagonal stamp: HACE CONSTAR]
[Diagonal stamp: Se da fotocopia cinco con...
[Diagonal stamp: Entónces que se ha tenido a...
[Diagonal stamp: NOTARIA DE BOGOTA]
[Diagonal stamp: 27 de mayo de 2012]
[Diagonal stamp: DC]



N 007422054

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

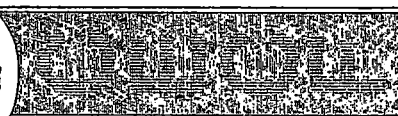
46

47

48

49

50



340
b
243

L 007495419

HOY DE
SANOS
ED. de
C. J. R.

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República

Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, **LEGALIZA** la firma

y sello del escribano **MARIA SILVINA LASARTE**

obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo

el N° **070312117346/0**

La presente legalización no juzga sobre

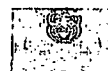
el contenido y forma del documento.

Buenos Aires, Lunes 12 de Marzo de 2007



[Handwritten signature]
ESC. EDDA ENRIQUETA SINELLI
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA

CONSEJERO



BOGOTÁ NOTARIA VEINTISIETE (27)
CIRCULO DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ
HACE CONSTAR
Que esta fotocopia coincide con una copia
original que se ha tenido a la vista.
11-8-2008
EUGENIA ROJAS DE URUETA
NOTARIA
Bogotá D.C.

REPUBLICA
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00115229

APOSTILLE

1. PAIS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por EDDA ENRIQUETA SINELLI

3. Quien actúa en calidad de CONSEJERA

4. Lleva el sello / timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS
AIRES

5. En LA CIUDAD DE BUENOS AIRES 6. El día 12/03/2007

7. Por EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 070312054713

9. Sello / Timbre
BUENOS
AIRES



10. Firma

[Handwritten signature]

EDDA ENRIQUETA SINELLI
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA

NOTARIA NOTARIA VENTISIEVE (27)
CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA
HACE CONSTAR
Que ésta fotocopia elide con una copia
auténtica que se ha tenido la vista
18 SEP
NOTARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA
NOTARIA Bogotá D.C.

Certificado de registro según § 21 disposición notarial nacional
(B/Voto)

345
342

Debido a mi verificación en el registro mercantil del juzgado Charlottenburg del número comercial HRB 283 B el día 27.04.2007 confirmo:

A través de resolución de la Asamblea General del 13.09.2006 Schering Sociedad Anónima ha cambiado la empresa (§ 1 párrafo 1 del reglamento) a Bayer Schering Pharma Sociedad Anónima.

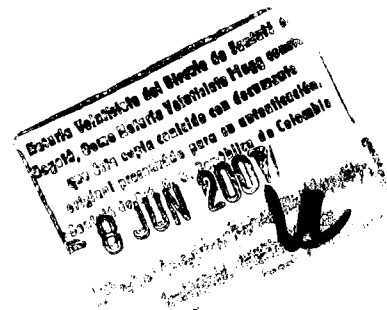
Este cambio entró en vigor el 29.12.2006. La inscripción en el registro mercantil fue efectuada el 20.12.2006.

Berlín, 27. Abril 2007

Firma

Sello – Dimitri Rempen – Notario en Berlín

Notario



Watzke

Adolf Watzke
Traductor oficial
Res. 2433 Min. Justicia

9 343

APOSTILLE
(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: República Federal de Alemania

Este documento publico

2. está firmado por Dimitri R E M P E N _____

3. en su calidad de Notario en Berlín _____

4. está proveída con el sello
del Notario _____

confirmado

5. en Berlín

6. el 02.05.2007

7. por el presidente de la audiencia provincial en Berlín

8. bajo el número. 9101 a E-F 2563/07

9. Sello

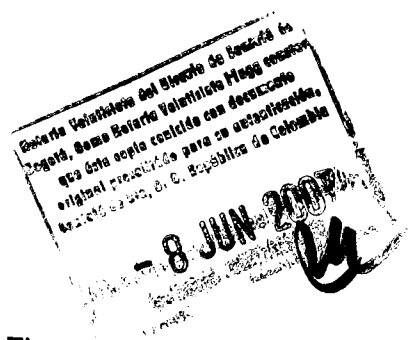
10. Firma
p.o. (por order)

Firma ilegible

B ü n n i n g

(jueza presidente de la audiencia provincial)

AVR 95a



Adolf Watzke
Traductor oficial
Res. 2433 Min. Justicia

344

Apostille
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von Dimitri R e m p e n

3. in seiner Eigenschaft als Notar in Berlin

4. sie ist versehen mit dem Siegel

des Notars

Bestätigt

5. in Berlin 6. am 02.05.2007

7. durch den Präsidenten des Landgerichts in Berlin

8. unter Nr. 9101a E-F 2563/07

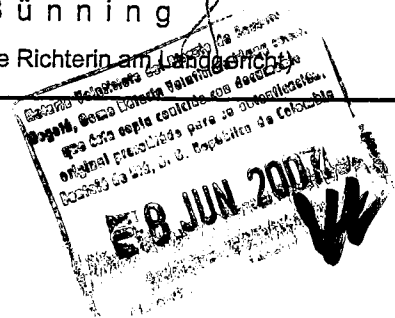
9. Siegel/
Stempel

10. Unterschrift

Im Auftrage

Bünning
Bünning

(Vorsitzende Richterin am Landgericht)



14 348
345

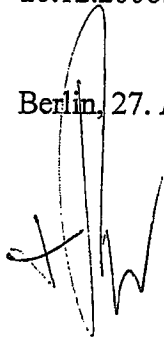
Registerbescheinigung gemäß § 21 BNotO

Aufgrund meiner Einsicht in das Handelsregister des Amtsgerichts Charlottenburg zur
Geschäftsnummer HRB 283 B am 27.04.2007 bescheinige ich hiermit:

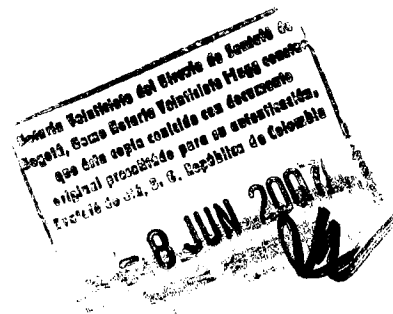
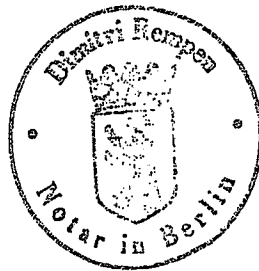
Durch Beschluss der Hauptversammlung vom 13.09.2006 hat die Schering Aktiengesellschaft
die Firma (§ 1 Absatz 1 der Satzung) in Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft geändert.

Die Änderung wurde am 29.12.2006 wirksam. Die Eintragung im Handelsregister erfolgte am
20.12.2006.

Berlin, 27. April 2007



Notar



12-346
346

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 53,609
FECHA : JULIO 22 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 06-034994- -00003-0000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 06-034944- -00007-0000
Fecha: 2009-07-22 17:23:21 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 12

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105797226	22/07/2009	6,760,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	111,000.00
		TOTAL :	\$ 111,000.00

SON: CIENTO ONCE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

RADICACIÓN EXPEDIENTE No. 06-34944

EL EXTRACTO DE LA PRESENTE SOLICITUD DE **PATENTE DE INVENCION**
FUE PUBLICADO EN LA GACETA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL No **587** DE
FECHA **18 DE ENERO DE 2008** EL TÉRMINO HÁBIL SEÑALADO POR LA LEY
EXPIRA EL **16 DE ABRIL DE 2008**

NOTA: Dentro del plazo de los seis (6) meses siguientes a partir de la fecha de publicación en la gaceta de Propiedad Industrial, deberá solicitar y cancelar el examen de patentabilidad so pena de que la solicitud caiga en abandono, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486/2000.

SE PRESENTARON OPOSICIONES POR PARTE DE TERCEROS.

SI _____ NO X

Título de la solicitud: "Reconocimiento dirigido de la vasculatura tumoral usando el anticuerpo L19 contra ED-B de fibronectina marcado radioactivamente".

El objeto de la presente solicitud de patente de invención consiste en suministrar un anticuerpo que se une a ED-B de fibronectina y que es de utilidad en el reconocimiento de tumores.

El problema planteado en esta solicitud es que los anticuerpos monoclonales no humanos en general y los anticuerpos contra ED-B de fibronectina, no presentan buenos resultados de inmunogenicidad.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona un elemento de unión específico que se une a la ED-B humana de fibronectina, donde el elemento de unión comprende una mini-inmunoglobulina y esta marcado radioactivamente.

El objeto de la solicitud definida anteriormente se clasificó en la IPC: A61K 51/10; 51/02; A61P 35/00; A61K 39/395

3. De la solicitud de Patente

3.1. Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio presentado carece de concisión y claridad por cuánto:

- 1) La reivindicación 1 que menciona un elemento de unión específico carece de claridad por cuanto no es claro los elementos que componen tal elemento, por ejemplo la inclusión de isótopos no aparece en la parte caracterizante de la reivindicación. También se recomienda definir el anticuerpo por todos sus elementos y la estructura de cada uno de ellos (la SEQ de cada región CDR) y omitir la inclusión de referencias bibliográficas. Por último se recomienda definir el producto principal de la solicitud como un anticuerpo y no como un elemento de unión específico, puesto que técnicamente esta definición puede corresponder a diferentes moléculas;
- 2) Hay una inconsistencia entre la materia divulgada en la descripción y la materia colocada en las reivindicaciones, específicamente en lo referente a:
 - los isótopos utilizados para marcar el elemento de unión mencionados en la reivindicación 1 (^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{211}At)
 - la molécula de unión mencionada en la RV 1 (mini-inmunoglobulina, molécula completa de IgG1)

puesto que en la descripción menciona y ejemplifica con los isótopos mencionados en la RV1 con una mini-inmunoglobulina, denominada SIP (folios 177 a 187), mientras que la molécula IgG1 completa únicamente se une con el isótopo ^{125}I (folios 188 a 207), el cual no es mencionado en la reivindicación 1.

- 3) El método definido en la reivindicación 11, no menciona las etapas o fases que comprende la producción del elemento mencionado;
- 4) La reivindicación 17 carece de sustento en la descripción, puesto que no es posible determinar a que elemento adicional se refiere;

De esta manera, el capítulo reivindicatorio presentado no cumple con los requisitos establecidos en el art. 30 de la Decisión 486.

4. Excepción a la patentabilidad (artículo 20 D486 literal d))

El método propuesto en las reivindicaciones 23 a 25 corresponde a un método de tratamiento del eventos angiogénicos que puede ser aplicado a humanos o animales; según la norma comunitaria los métodos de diagnóstico y tratamiento están excluidos de patentabilidad, la materia reclamada en esta cláusula no podrá ser patentada.

De esta manera y de acuerdo a lo establecido en el artículo 20 de la Decisión 486 el contenido de las citadas reivindicaciones deberá excluirse.

5. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (artículos 14 y 21 D 486)

La materia de las reivindicaciones 22, 26 a 28 reclama el uso del elemento de unión o la composición definida en las reivindicaciones 1 a 10 para el tratamiento de eventos angiogénicos; según la norma comunitaria los usos no son materia susceptible de patente.

De esta manera y de acuerdo a lo establecido en los artículos 14 y 21 de la Decisión 486 la materia de las reivindicaciones 22, 26 a 28 no sería patentable.

6. Determinación del Estado de la Técnica

La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el Estado de la Técnica es:
Fecha de presentación de la solicitud prioritaria 10/09/2003.

Teniendo en cuenta la fecha indicada se realizó la búsqueda en el estado de la técnica de documentos relacionados con la solicitud encontrándose los siguientes documentos más relevantes:

Nº	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	Borsil, <i>et.al.</i> International Journal of Cancer, Vol 102 (Nº1): 75-85, Nov 2002	"Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin"	11/2002
D2	De Martis S., <i>et.al.</i> Eur. J.Nucl Med. Vol 28 (Nº4): 534-539	"Selective targeting of tumour neovasculature by a radiohalogenated human antibody fragment specific for the ED-B domain of fibronectin"	04/2001
D3	Santimaria, <i>et.al.</i> Clin. Cancer Res. Vol 9: 571-579.	"Immunoscintigraphic Detection of the ED-B Domain of Fibronectin, a Marker of Angiogenesis, in Patients with Cancer"	02/2003
D4	WO 01/62800	"Antibody specific for the ED-B domain of fibronectin, conjugates comprising said antibody, and their use for the detection and treatment of angiogenesis"	08/2001

Resumen de los documentos citados:

D1: Divulga que un recombinante humano de scFv, L19, reacciona con el dominio de ED-B de fibronectina, un marcador de angiogénesis. Usando la región variable de L19 se construyó y expresó una inmunoproteína pequeña humana, denominada SIP y una IgG1 completa humana y se realizaron estudio de biodistribución en ratones con tumor. Adicionalmente, se indica la aplicabilidad de la investigación a estudios clínicos con humanos, dado el 100% de homología que hay en la ED-B de humano y ratón.

D2: Demuestra que scFv (L19), un fragmento de anticuerpo humano recombinante con afinidad sub-nano molar para el dominio ED-B de fibronectina, un marcador de angiogénesis, puede ser establemente marcado con ^{125}I y astatina ^{211} con total retención de inmunoreactividad.

D3: Se evalúa la posibilidad de marcar tumores primarios y lesiones metastáticas en pacientes con cáncer a través de la inmunocintigrafía usando el dimerico ^{123}I -L19 [L19(scFv)2]. Se establece que el L19 (scFv)2 es capaz de distinguir entre lesiones quiescentes y de crecimiento activo.

D4: Divulga anticuerpos específicos contra el dominio ED-B de fibronectina con una constante de disociación sub-nano molar. Un objeto adicional de la invención es suministrar anticuerpos radio marcados en formatos disponibles, dirigidos contra ED-B de fibronectina, que detecta lesiones de tumor pocas horas después de ser aplicados.

7. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

7.1. Novedad (artículo 16 D486)

La solicitud reclama "un elemento de unión específico que se une al ED-B humano, donde dicho elemento de unión específico está marcado con un isótopo seleccionado del grupo formado por ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{211}At y comprende un sitio de unión al antígeno que comprende un dominio de anticuerpo VH y un dominio de anticuerpo VL..." (reivindicación 1). Además se reclama el método para producir tal elemento de unión específico (reivindicación 11).

Tal como lo manifestó la autoridad internacional en el informe del examen preliminar internacional de patentabilidad, esta oficina considera como relevantes los documentos D1, D2, D3 y D4 para afectar la novedad de la invención reclamada, de acuerdo con los argumentos ya manifestados por esta autoridad (ver folios 262 a 264).

Adicionalmente, deseamos resaltar que pese a la omisión del isótopo ^{125}I en la reivindicación 1, la inclusión de este en la memoria descriptiva, la ejemplificación de la molécula de interés IgG1 con este isótopo (ver folio 187) y el tipo de reivindicación empleado (redacción abierta) que usa el término "**comprende...**", implica que este isótopo ^{125}I y otros están contemplados por la invención.

Por tanto, a la luz de la divulgación D1, D2, D3 ó D4, la invención carece de novedad e incumple el artículo 16 de la D486.

8. Conclusión:

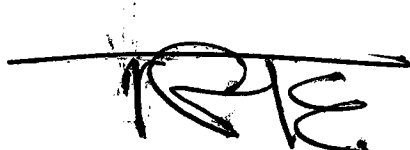
Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

N°	Documento N°	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	Borsil, <i>et al.</i> International Journal of Cancer, Vol 102 (N°1): 75-85.	1-28	Novedad
D2	De Martis S., <i>et al.</i> Eur. J. Nucl Med. Vol 28 (N°4): 534-539	1-28	Novedad
D3	Santimaria, <i>et al.</i> Clin. Cancer Res. Vol 9: 571-579.	1-28	Novedad
D4	WO 01/62800	1-28	Novedad

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de 60 días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar

respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

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



JOSE LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha
11 de mayo de 2011

CONCEPTO TÉCNICO No. 4194	EXAMINADOR TÉCNICO Código No.202052
-------------------------------------	---



SELECTIVE TARGETING OF TUMORAL VASCULATURE: COMPARISON OF DIFFERENT FORMATS OF AN ANTIBODY (L19) TO THE ED-B DOMAIN OF FIBRONECTIN

Laura BORSI¹, Enrica BALZA¹, Marco BESTAGNO², Patrizia CASTELLANI¹, Barbara CARNEMOLLA¹, Atila BIRO³, Alessandra LEPRINI³, Jorge SEPULVEDA², Oscar BURRONE², Dario NERI⁴ and Luciano ZARDI^{1*}

¹Laboratory of Cell Biology, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genoa, Italy

²International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Area Science Park, Trieste, Italy

³Philogen srl, Genoa, Italy

⁴Department of Applied BioSciences of the Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich, Switzerland

We recently demonstrated that a human recombinant scFv, L19, reacting with the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, selectively targets tumoral vasculature *in vivo*. Using the variable regions of L19, we constructed and expressed a human "small immunoprotein" (SIP) and a complete human IgG1 and performed biodistribution studies in tumor-bearing mice to compare the blood clearance rate, *in vivo* stability and performance in tumor targeting of the 3 L19 formats [dimeric scFv (scFv)₂, SIP and IgG1]. The accumulation of the different antibody formats in the tumors studied was a consequence of the clearance rate and *in vivo* stability of the molecules. Using the SIP, the %ID/g in tumors was 2–5 times higher than that of the (scFv)₂, reaching a maximum 4–6 hr after injection. By contrast, the accumulation of IgG1 in tumors constantly rose during the experiments. However, due to its slow clearance, the tumor-blood ratio of the %ID/g after 144 hr was only about 3 compared to a ratio of 10 for the (scFv)₂ and 70 for the SIP after the same period of time. The different *in vivo* behavior of these 3 completely human L19 formats could be exploited for different diagnostic and/or therapeutic purposes, depending on clinical needs and disease. Furthermore, the fact that ED-B is 100% homologous in human and mouse, which ensures that L19 reacts equally well with the human and the murine antigen, should expedite the transfer of these reagents to clinical trials.

© 2002 Wiley-Liss, Inc.

Key words: antibody formats; tumor vasculature; tumor targeting; clinical applications; cancer diagnosis and therapy

Despite their enormous potential as therapeutic agents, monoclonal antibodies (mAbs) of nonhuman origin have not performed as well as expected in clinical trials as a result of their immunogenicity,^{1,2} poor pharmacokinetic properties^{3,4} and inefficiency in recruiting effector functions.^{5,6} The recent prospect of isolating human antibody fragments from phage display libraries^{7–10} transcends these problems, revitalizing studies and rekindling hopes of using these reagents to treat major diseases. Indeed, these molecules should serve as ideal building blocks for novel diagnostic and therapeutic tools.^{11,12} Furthermore, these antibodies can be "matured" to reach affinities in the picomolar range,¹³ desirable, if not necessary, for their clinical use.^{14,15}

Clinical applications of human antibody fragments for the selective delivery of diagnostic or therapeutic agents nonetheless require highly specific targets. In the case of tumors, the most popular targets are cell-surface antigens, which are usually neither abundant nor stable. On the other hand, during tumor progression the microenvironment surrounding tumor cells undergoes extensive modification that generates a "tumoral environment" that could ultimately represent a suitable target for antibody-based tumor therapy.¹⁶ In fact, the concept that the altered tumor microenvironment is itself a carcinogen that can be targeted is increasingly gaining consensus. Molecules that are able to effectively deliver therapeutic agents to the tumor microenvironment thus represent promising and important new tools for cancer therapy.^{16–18}

Fibronectin is an extracellular matrix (ECM) component that is widely expressed in a variety of normal tissues and body fluids. Different FN isoforms can be generated by the alternative splicing of the FN pre-mRNA, a process that is modulated by cytokines and extracellular pH.^{19–22} The complete type III repeat ED-B may be entirely included or omitted in the FN molecule.²³ ED-B is highly conserved in different species, having 100% homology in all mammals thus far studied (human, rat, mouse) and 96% homology with a similar domain in chicken. The FN isoform containing ED-B (B-FN) is undetectable immunohistochemically in normal adult tissues, with the exception of tissues undergoing physiologic remodeling (*e.g.*, endometrium and ovary) and during wound healing.^{20,24} By contrast, its expression in tumors and fetal tissues is high.²⁰ Furthermore, we demonstrated that B-FN is a marker of angiogenesis²⁵ and that endothelial cells invading tumor tissues migrate along ECM fibers containing B-FN.²⁶

We recently reported on the possibility to selectively target tumoral vasculature using a human recombinant antibody, L19(scFv),¹³ specific for the B-FN isoform.^{15,27–29} This observation paved the way for the antibody's use in both *in vivo* diagnostic (immunoscintigraphy) and therapeutic approaches entailing the selective delivery of therapeutic radionuclides or toxic agents to tumoral vasculature. In addition, Birchler *et al.*³⁰ showed that L19(scFv), chemically coupled to a photosensitizer, selectively accumulates in the newly formed blood vessels of the angiogenic rabbit cornea model and, after irradiation with near infrared light, mediates the complete and selective occlusion of ocular neovasculature. More recently, Nilsson *et al.*³¹ reported that the immunoconjugate of L19(scFv) with the extracellular domain of tissue factor mediates selective infarction in different types of murine tumor models. Furthermore, fusion proteins of L19(scFv) and IL-2 or IL-12 have shown the enhanced therapeutic efficacy of these 2 cytokines.^{32,33} Finally, since L19 reacts equally well with mouse and human ED-B, it can be used for both preclinical and clinical studies.

Different antibody formats have shown diverse behavior in terms of *in vivo* stability, clearance and performance in tumor

Grant sponsor: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC); Grant number: EU BIO4-CT97-2149; Grant sponsor: Italian Health Ministry; Grant sponsor: Krebsforschung Schweiz; Grant sponsor: Bundesamt für Bildung und Wissenschaft; Grant sponsor: Philogen s.r.l.

*Correspondence to: Laboratory of Cell Biology, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi, 10, 16132 Genoa, Italy. Fax: +39-010-352855. E-mail: luciano.zardi@tin.it

Received 13 May 2002; Revised 17 July 2002; Accepted 25 July 2002

DOI 10.1002/ijc.10662

targeting.³⁴ In order to select the formats suitable for different possible clinical applications, we prepared, characterized and investigated the *in vivo* biodistribution of 3 L19 human molecules, namely, the dimeric scFv (scFv)₂, a small immunoprotein (SIP)³⁵ and a complete IgG1.

MATERIAL AND METHODS

Preparation and expression of scFv, small immunoprotein (SIP) and IgG1 constructs.

ScFv. The L19(scFv) (Fig. 1) is an affinity matured ($K_d = 5.4 \times 10^{-11}$ M) antibody fragment specifically directed against the ED-B domain of fibronectin.¹³ The D1.3 (scFv),^{7,28} a mouse-anti-hen egg white lysozyme scFv, was used as a control. These scFvs were expressed in *E. Coli* strain HB2151 (Maxim Biotech, San Francisco, CA) according to Pini *et al.*³⁶

SIP. To construct the L19 small immunoprotein (L19-SIP) gene (Fig. 1), the DNA sequence coding for the L19(scFv) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using Pwo DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Milan, Italy), according to the manufacturer's recommendations, with primers BC-618 (gtgtgcactcggaggtgcagct-gtggagctctggg) and BC-619 (gcctccggattgattccaccttggtccctggcc), containing the ApaLI and BspEI restriction sites, respectively. The amplification product was inserted into the pUT- ϵ SIP vector, which provides the scFv gene with a secretion signal required for secretion of proteins in the extracellular medium. The pUT- ϵ SIP vector was obtained from the previously described pUT-SIP-long³⁵ after substituting the human constant γ 1-CH3 domain with the CH4 domain of the human IgE secretory isoform IgE-S2 (ϵ_{S2} -CH4).³⁷ CH4 is the domain that allows dimerization in the IgE molecule and the ϵ_{S2} isoform contains a cysteine at the carboxyterminal end, which stabilizes the IgE dimer through an interchain disulphide bond. In the final SIP molecule, the L19(scFv) was connected to the ϵ_{S2} -CH4 domain by a short GGSG linker. The SIP gene was then excised from the plasmid pUT- ϵ SIP-L19 with HindIII and EcoRI restriction enzymes and cloned into the mammalian expression vector pcDNA3 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), which contains the cytomegalovirus

(CMV) promoter, in order to obtain the construct pcDNA3-L19-SIP.

The DNA sequence coding for D1.3(scFv) was amplified using the primers BC-721 (ctcgtgcactcgcaggtgcagctgcaggagtc) and BC-732 (ctctccggaccgttgatctcgcgcttggt) and inserted into the pUT- ϵ SIP vector. The D1.3-SIP gene was then excised from the pUT- ϵ SIP-D1.3 with HindIII and EcoRI restriction enzymes and cloned into pcDNA3 in order to obtain the construct pcDNA3-D1.3-SIP.

These constructs were used to transfect SP2/0 murine myeloma cells (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD) using FuGENE 6 transfection reagent (Roche), following the protocol for adherent cells optimized by the manufacturer. Transfectomas were grown in DMEM supplemented with 10% FCS and selected using 750 μ g/ml of Geneticin (G418, Calbiochem, San Diego, CA).

IgG1. To prepare the complete IgG1, the variable region of the L19 heavy chain (L19-VH), together with its secretion peptide sequence, was excised with HindIII and XhoI from the previously described L19-pUT ϵ SIP and inserted in the pUC-IgG1 vector, containing the complete human γ 1 constant heavy-chain gene. The recombinant IgG1 gene was then excised from the pUC-IgG1-L19-VH with HindIII and EcoRI and cloned into pcDNA3 to obtain the construct pcDNA3-L19-IgG1.

For the preparation of the complete L19 light chain, L19-VL was amplified from the L19-pUT- ϵ SIP (described above) by PCR using the primers BC-696 (tggtgtgcactcggaaattgtgtgacgcagtc) and BC-697 (ctctcgtacgttgattccaccttggtcc), containing ApaLI and BsiWI restriction sites, respectively. After digestion with ApaLI and BsiWI, the amplification product was inserted in the vector pUT-SEC-hCk containing the secretion signal sequence and the sequence of the human constant κ light chain. The recombinant light-chain gene was then excised from pUT-SEC-hCk-L19-VL with HindIII and XhoI and inserted in the pCMV2A mammalian expression vector, derived from a pcDNA3 vector by removing the resistance gene to G418, to obtain the construct pCMV2A-L19- κ .

Equimolar amounts of these constructs were used to cotransfect SP2/0 murine myeloma cells as described above. Geneticin-selected clones were screened by ELISA for their ability to secrete chimeric immunoglobulin complete with heavy and light chains.

All DNA constructs were purified using the Maxiprep system from Qiagen (Hilden, Germany), and the DNA sequences of both strands of the constructs were confirmed using the ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Foster City, CA). All restriction enzymes (RE) were from Roche Diagnostics, with the exception of BsiWI (New England Biolabs, Beverly, MA). After RE digestion, inserts and vectors were recovered from agarose gels using the Qiaquick method (Qiagen).

Purification and quality control of antibodies

Immunoaffinity chromatography was performed to purify the different antibodies according to the procedure described by Carnemolla *et al.*²⁷

ED-B conjugated to Sepharose 4B (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) following the manufacturer's instructions²⁷ was used to immunopurify all different L19 antibody formats, while a column of hen egg white lysozyme (Sigma, St. Louis, MO) conjugated to Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) was used for D1.3 antibodies.

The immunopurified antibody formats L19-SIP and L19-IgG1 required no further purification and were dialyzed against PBS, pH 7.4, at +4°C. Since scFvs obtained from immunoaffinity chromatography are made up of 2 forms, monomeric and dimeric, a second purification step, as described by Demartis *et al.*²⁹ was required to isolate the latter dimeric form.

Batches of the different antibody formats were prepared and analyzed using SDS-PAGE under reducing and nonreducing con-

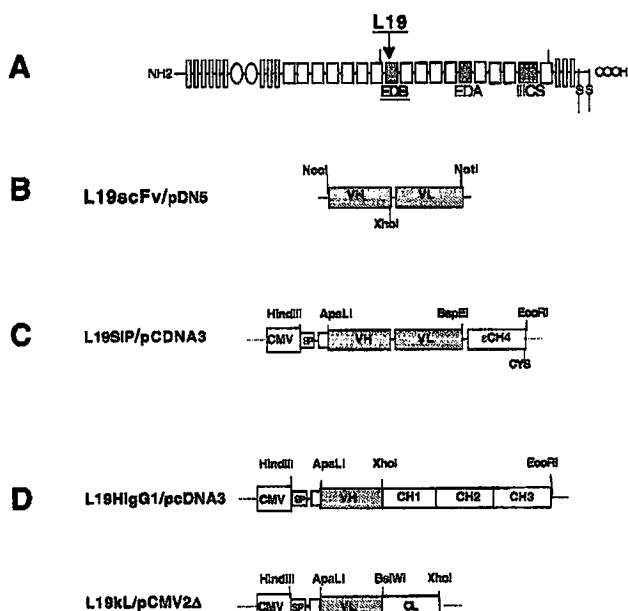


FIGURE 1—(a) Model of the domain structure of an FN subunit. The protein sequences undergoing alternative splicing are indicated in gray. As indicated, the epitope of the recombinant antibody L19 is localized within the repeat ED-B. Schemes of the constructs used to express L19(scFv) (b); L19-SIP (c); and L19-IgG1/ κ (d).

Selective targeting of tumour neovasculature by a radiohalogenated human antibody fragment specific for the ED-B domain of fibronectin

Salvatore Demartis¹, Lorenzo Tarli¹, Laura Borsi², Luciano Zardi², Dario Neri¹

¹ Institute of Pharmaceutical Sciences, Swiss Federal Institute of Technology Zürich, Building 36 M14, Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich, Switzerland

² Laboratory of Cell Biology, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genoa, Italy

Received 19 November 2000 and in revised form 2 January 2001 / Published online: 9 March 2001

© Springer-Verlag 2001

Abstract. Angiogenesis is a characteristic feature of many aggressive tumours and other disorders. Antibodies capable of binding to new blood vessels, but not to mature vessels, could be used as selective targeting agents for immunoscintigraphic and radioimmunotherapeutic applications. Here we show that scFv(L19), a recombinant human antibody fragment with sub-nanomolar affinity for the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, can be stably labelled with iodine-125 and astatine-211 with full retention of immunoreactivity, using a trimethyl-stannyl benzoate bifunctional derivative. Biodistribution studies in mice bearing two different types of tumour grafted subcutaneously, followed by ex vivo micro-autoradiographic analysis, revealed that scFv(L19) rapidly localises around tumour blood vessels, but not around normal vessels. Four hours after intravenous injection of the stably radioiodinated scFv(L19), tumour to blood ratios were 6:1 in mice bearing the F9 murine teratocarcinoma and 9:1 in mice bearing an FE8 rat sarcoma. As expected, all other organs (including kidney) contained significantly less radioactivity than the tumour. Since the ED-B domain of fibronectin has an identical sequence in mouse and man, scFv(L19) is a pan-species antibody and the results presented here suggest clinical utility of radiolabelled scFv(L19) for the scintigraphic detection of angiogenesis in vivo. Furthermore, it should now be possible to investigate scFv(L19) for the selective delivery of ²¹¹At to the tumour neovasculature, causing the selective death of tumour endothelial cells and tumour collapse.

Keywords: Angiogenesis – Astatine-211 – Oncofetal ED-B domain of fibronectin – ScFv antibody fragment – Radioimmunotherapy

Eur J Nucl Med (2001) 28:534–539

DOI 10.1007/s002590100480

Introduction

The proliferation of new blood vessels from pre-existing ones (angiogenesis) is a rare process in the adult, except in the context of the female reproductive cycle. However, angiogenesis is a characteristic feature of aggressive solid tumours and of other diseases, such as age-related macular degeneration, diabetic retinopathy, psoriasis and rheumatoid arthritis [1]. Molecules capable of selectively targeting new blood vessels, but not pre-existing blood vessels and healthy tissues, may open significant diagnostic and therapeutic opportunities.

A good-quality marker for both tumoural and non-tumoural neovasculature is the extra-domain B (ED-B) of fibronectin – a sequence of 91 amino acids identical in mouse, rat, rabbit, dog and man, that can be inserted into the fibronectin molecule by a mechanism of alternative splicing [2, 3, 4]. Fibronectin containing ED-B (B-FN) is a naturally occurring marker of angiogenesis, which accumulates around neovascular structures in aggressive tumours and other tissues undergoing angiogenesis, such as the endometrium in the proliferative phase and some ocular structures in pathological conditions, but is otherwise undetectable in normal adult tissues.

To date, the production of monoclonal antibodies that directly recognise the ED-B domain in B-FN has not been possible using hybridoma technology, because of tolerance. This problem, however, could be overcome using antibody phage technology with large synthetic an-

Dario Neri (✉)
Institute of Pharmaceutical Sciences,
Swiss Federal Institute of Technology Zurich,
Building 36 M14, Winterthurerstrasse 190,
8057 Zürich, Switzerland
e-mail: neri@pharma.anbi.ethz.ch
Tel.: +41-1-6356063, Fax: +41-1-6356886

Advances in Brief

Immunoscintigraphic Detection of the ED-B Domain of Fibronectin, a Marker of Angiogenesis, in Patients with Cancer¹

Monica Santimaria, Giovanni Moscatelli,
Giuseppe L. Viale, Leonardo Giovannoni,
Giovanni Neri, Francesca Viti,
Alessandra Leprini, Laura Borsi,
Patrizia Castellani, Luciano Zardi,² Dario Neri,
and Pietro Riva

Servizio di Medicina Nucleare, Ospedale M. Bufalini, 47023 Cesena, Italy [M. S., G. M., P. R.]; Division of Neurosurgery Di.S.C.A.T. Department of Surgery, University of Genoa, Medical School, 16132 Genoa, Italy [G. L. V.]; Philogen S.r.l., 53100 Siena, Italy [L. G., G. N., F. V., A. L.]; Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, 16132 Genova, Italy [L. B., P. C., L. Z.]; Institute of Pharmaceutical Sciences, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, CH-8057 Zurich, Switzerland [D. N.]; and Istituto Oncologico Romagnolo, Forlì, Italy [P. R.]

Abstract

Purpose: ED-B fibronectin is expressed only during angiogenic processes and in tissues undergoing growth and/or extensive remodeling. We demonstrated previously the possibility to target and selectively deliver therapeutic substances to tumor vasculature in experimental animal models using a human recombinant antibody fragment, L19, specific for the ED-B domain of fibronectin. Here we evaluate the possibility of targeting primary tumors and metastatic lesions in cancer patients through immunoscintigraphy using ¹²³I-labeled dimeric L19 [L19(scFv)₂].

Experimental Design: Twenty patients (34–79 years of age) with lung, colorectal, or brain cancer, whose tumors had been confirmed by imaging techniques and/or histologically, were admitted to the immunoscintigraphic investigation.

Results: The dimeric L19 antibody selectively localized in tumor lesions in aggressive types of lung cancer and colorectal cancer. Because ED-B fibronectin is expressed only during angiogenic processes and in tissues undergoing growth and/or extensive remodeling, L19(scFv)₂ is able to distinguish between quiescent and actively growing lesions. No side effects were observed.

Conclusions: The ability of L19(scFv)₂ to target tumors in patients provides the foundations for new therapeutic applications, in which the L19 antibody is engineered to selectively deliver bioactive molecules to primary tumors as well as to metastases.

Introduction

Angiogenesis, *i.e.*, the proliferation of new blood vessels from pre-existing ones, is a characteristic feature of aggressive solid tumors and other relevant disorders, such as age-related macular degeneration, diabetic retinopathy, and rheumatoid arthritis (1–3). The switch of solid tumors from a poorly vascularized state to a condition in which exuberant angiogenesis provides tumor cells with oxygen and nutrients often corresponds to the onset of a more aggressive phenotype (4).

The noninvasive imaging of angiogenesis and tissue remodeling processes *in vivo* would prove to be dramatically advantageous over current methods, because it would yield information about both the location and the growth dynamics of lesions. Because neovasculature and tissue remodeling are required for the growth of all aggressive solid tumors, the same imaging approach could be used for different types of cancer. Furthermore, the proven ability of a molecule (*e.g.*, a human monoclonal antibody fragment) to selectively localize in new blood vessels or actively remodeling tissues would herald a number of therapeutic strategies in which bioactive compounds are selectively targeted to angiogenic sites (5, 6).

Imaging of angiogenesis in animal models and in patients with cancer has been attempted, using computed tomography, MRI, ultrasound, and scintigraphic techniques, to assess changes in vascular permeability and tumor blood flow during antiangiogenic therapy (7). However, a quantitative distinction between vascularity and angiogenesis would be expedient, because a number of benign tumors are known to be highly vascular despite a low rate of new blood vessel formation (8). Imaging of angiogenesis using molecular targeting agents (*e.g.*, antibody fragments) may provide the means to achieve this goal.

Specific ligands of the integrin $\alpha v \beta 3$ have been used for imaging of angiogenesis in preclinical models (9, 10), but results from an immunoscintigraphic clinical trial with the humanized anti $\alpha v \beta 3$ antibody Vitaxin has thus far been disappointing (11). We focused our attention on the ED-B³ of fibronectin, a marker of angiogenesis and tissue remodeling (8, 12–15). This sequence of 91 amino acids, identical in mouse, rat, rabbit, dog, and humans, can be inserted into the fibronectin molecule by a mechanism of alternative splicing at the level of the primary fibronectin transcript. Fibronectin containing ED-B (B-FN) ac-

Received 5/9/02; revised 7/29/02; accepted 8/21/02.

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.

¹ Supported in part by the Italian Association for Cancer Research (AIRC), and the European Union Project QLK3-CT-2001-01495.

² To whom requests for reprints should be addressed, at Laboratorio di Biologia Cellulare, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi 10, 16132 Genova, Italy. Phone: 39-010-5737371; Fax: 39-010-352855; E-mail: luciano.zardi@tin.it.

³ The abbreviations used are: ED-B, extra-domain B; ¹²³I, iodine-123; SPECT, single-photon emission computerized tomography; CT, computerized tomography; MRI, magnetic resonance imaging.

354
D4
354

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 August 2001 (30.08.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/62800 A1

- (51) International Patent Classification⁷: **C07K 16/18**,
A61K 51/10, G01N 33/53, 33/574, 33/577, C07C 63/06,
A61P 35/00
- (21) International Application Number: PCT/EP01/02062
- (22) International Filing Date: 23 February 2001 (23.02.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/512,082 24 February 2000 (24.02.2000) US
- (71) Applicant: **EIDGENÖSSISCHE TECHNISCHE
HOCHSCHULE ZÜRICH** [CH/CH]; Rämistrasse 101,
CH-8092 Zürich (CH).
- (72) Inventors: **NERI, Dario**; Imbisbühlsteig 22, CH-8049
Zürich (CH). **TARLI, Lorenzo**; Via Abbadia, 20, I-53035
Monteriggioni (IT). **VITI, Francesca**; Via Battaglini, 16,
I-16151 Genova (IT). **BIRCHLER, Manfred**; Anwand-
strasse 66, CH-8004 Zürich (CH).
- (74) Agent: **GERVASI, Gemma**; Notarbarloto & Gervasi
S.P.A., Corso di Porta Vittoria, 9, I-20122 Milano (IT).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

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

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

(54) Title: ANTIBODY SPECIFIC FOR THE ED-B DOMAIN OF FIBRONECTIN, CONJUGATES COMPRISING SAID ANTIBODY, AND THEIR USE FOR THE DETECTION AND TREATMENT OF ANGIOGENESIS

(57) Abstract: The present invention relates to antibodies with sub-nanomolar affinity specific for a characteristic epitope of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis. Furthermore, it relates to the use of radiolabelled high affinity anti ED-B antibodies for detecting new-forming blood vessels *in vivo* and a diagnostic kit comprising said antibody. Furthermore, it relates to conjugates comprising said antibodies and suitable photoactive molecules (e.g. an appropriately chosen photosensitizer or radionuclide), and their use for the selective light-mediated occlusion of new blood vessels.

WO 01/62800 A1

present invention show different reactivity. Furthermore, the BC1 antibody recognises domain 7 alone, and domain 7-8 of fibronectin in the absence of the ED-B domain (Carnemolla et al. 1992, J. Biol. Chem. 267, 24689-24692). Such epitopes could be produced in vivo by proteolytic degradation of FN molecules.

5 The advantage of the reagents according to the present invention is that they can localise on FN molecules or fragments only if they contain the ED-B domain.

For the diagnosis of cancer, and more specifically for imaging primary and secondary tumour lesions, immunoscintigraphy is one of the techniques of choice. In this methodology, patients are imaged with a suitable device (e.g., a gamma
10 camera), after having been injected with radiolabelled compound (e.g., a radionuclide linked to a suitable vehicle). For scintigraphic applications, short-lived gamma emitters such as technetium-99m, iodine-123 or indium-111 are typically used, in order to minimise exposure of the patient to ionising radiations.

The most frequently used radionuclide in Nuclear Medicine Departments is
15 technetium-99m (99mTc), a gamma emitter with half-life of six hours. Patients injected with 99mTc-based radiopharmaceuticals can typically be imaged up to 12-24 hours after injections; however, accumulation of the nuclide on the lesion of interest at earlier time points is desirable.

Furthermore, if antibodies capable of rapid and selective localisation on newly-
20 formed blood vessels were available, researchers would be stimulated to search for other suitable molecules to conjugate to antibodies, in order to achieve diagnostic and/or therapeutic benefit.

Summary of the Invention

Considering the need of nuclear medicine for radiopharmaceuticals capable of
25 localising tumour lesions few hours after injection, and the information that antibody affinity appears to influence its performance in targeting of angiogenesis, it is an object of the present invention to produce antibodies specific for the ED-B domain of fibronectin with sub-nanomolar dissociation constant (for a review on the definitions and measurements of antibody-antigen affinity, see Neri et al.
30 (1996). Trends in Biotechnol. 14, 465-470). A further object of the present invention is to provide radiolabelled antibodies in suitable format, directed against the ED-B domain of fibronectin, that detect tumour lesions already few hours after