

B.T.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-110246

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO Anticuerpos Monoclonales al factor de
Crecimiento de Hepatocito

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL AGIK 39/395, C04K 16/22
C12N 5/20, G01N 35/53, 33/563, 33/574, 33/577

71. SOLICITANTE Galaxy Biotech, LLC.

DOMICILIO Cupertino, CA, Estados Unidos

74. APODERADO Dilia Maria Rodriguez D' Aleman

22. BOGOTÁ, D. C., Oct. 30/06.

PETITORIO			
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO Rad: 06-110246- -00000-0000 ec: 2004-10-30 16:50:29 Dep. 2020 NUECREACIONES ra. 11 PATENTE/MI ave: 378 FASENACIONALI ut 411 PRESENTACION Folios: 122	
		FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL <i>15-Nov-06</i>	
1) SOLICITUD DE: ☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.			
2) SOLICITANTE (71)	Nombre: GALAXY BIOTECH, LLC. Dirección: 22830 San Juan Road, Cupertino CA 95014, Estados Unidos Nacionalidad o domicilio: Cupertino, CA, Estados Unidos Lugar de constitución: California, Estados Unidos		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual <u> </u> NÚMERO <u> </u>
	Teléfono: Fax: E. Mail:		
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: 1. KIM, Kyung, Jin; 2. Su, Yi-Chi Dirección: 1. 22830 San Juan Road, Cupertino, California 95014 USA; 2. 62 Lois Lane, San Francisco, California 94134 USA Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores, estadounidenses		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/US2004/026565 Fecha: Agosto 13 de 2004 Publicación Internacional No. WO 2005/107800 A1 Fecha: Nov. 17, 2005			
6) Título (54) ANTICUERPOS MONOCLONALES AL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITO			
7) Clasificación Internacional: A61K 39/395, C07K 16/22, C12N 5/20, G01N 33/53, 33/563, 33/574, 33/577			
8) PRIORIDAD SI ☒ NO ☐		33) País de Origen ESTADOS UNIDOS	(32) Fecha ABRIL 15, 2004
			(31) Número de Solicitud 10/825,060
9) C mprobante de pag N°. 06-75,811. Fecha: OCTUBRE 2, 2006			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina			

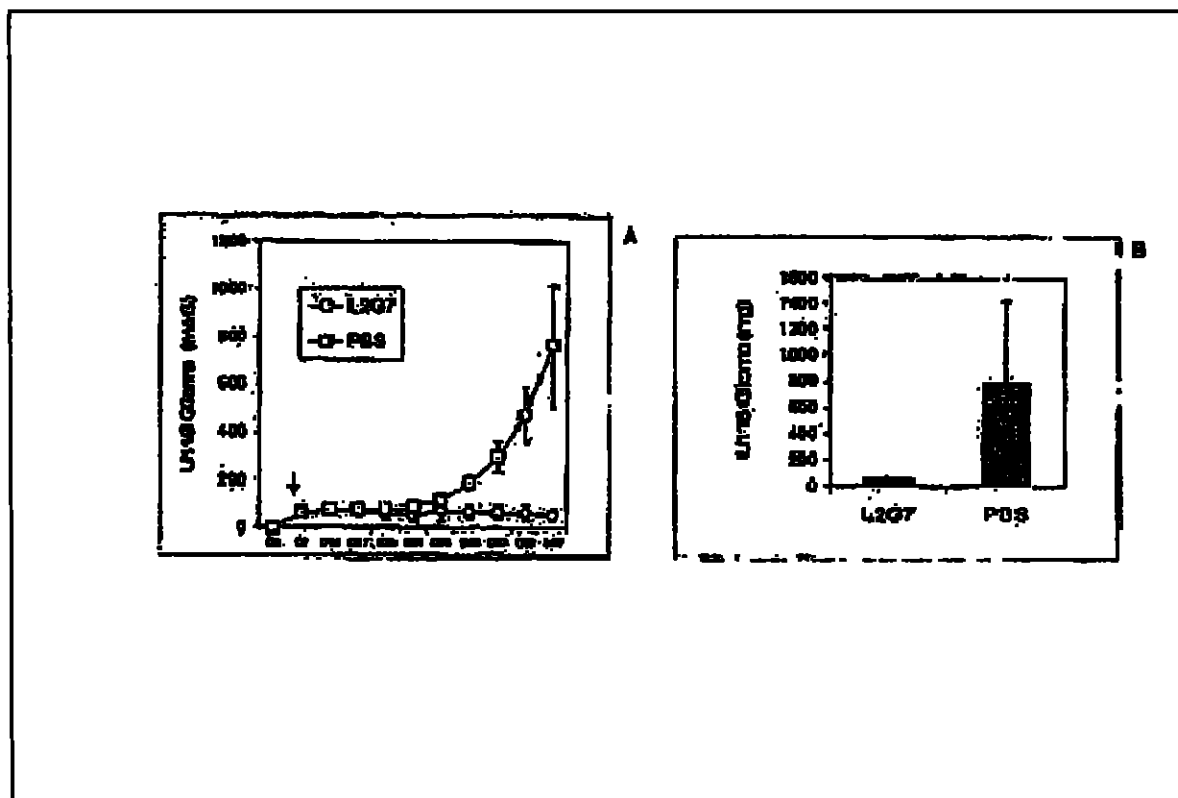
(Handwritten signature)

10)

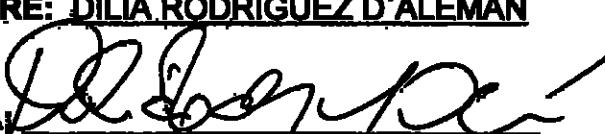
ANEX S

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
☐ Poderes, si fuera el caso
☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
☐ Declaraciones
☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
☒ Otros:
 1. Reporte internacional de búsqueda
 2. opinión escrita
 3. Notificación de la transmisión del documento de prioridad

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:



12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRIGUEZ D'ALEMANFIRMA: 

C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 860176009-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 75,011
FECHA : OCTUBRE 2 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-110246-00000-0000
De: 2006-10-30 16:50:29 Dep. 2020 NUECREACIONES
Ta. 11 PATENTE(YI)
Ive: 378 FASE NACIONAL I
Lr 411 PRESENTACION Folios: 122

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE NOBET Y CD. COLON	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	53370513	02/10/2006	11,649,000.00

CONCEPTO

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS



RESPONSABLE : _____

● CO DE CASA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 November 2005 (17.11.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/107800 A1

(51) International Patent Classification⁷: A61K 39/395,
C07K 16/22, C12N 5/20, G01N 33/53, 33/563, 33/574,
33/577

(21) International Application Number:
PCT/US2004/026565

(22) International Filing Date: 13 August 2004 (13.08.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
10/825,060 15 April 2004 (15.04.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
GALAXY BIOTECH, LLC [US/US]; 22830 San
Juan Road, Cupertino, CA 95014 (US).

(71) Applicants and
(72) Inventors: KIM, Kyung, Jin [US/US]; 22830 San Juan
Road, Cupertino, California 95014 (US); SU, Yi-Chi
[—/US]; 62 Lola Lane, San Francisco, California 94134
(US); YANG, Jihong [CN/US]; 275 Ventura Avenue,
#24, Palo Alto, California 94306 (US).

(74) Agents: LEHNSCHUETZ, Joe et al.; Townsend and
Townsend and Crew LLP, Two Embarcadero Center, 8th
Floor, San Francisco, California 94111-3834 (US).

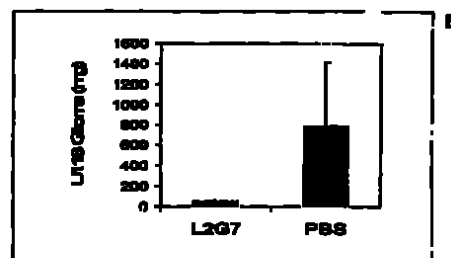
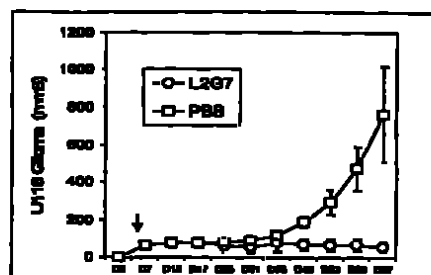
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

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

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES TO HEPATOCYTE GROWTH FACTOR



(57) Abstract: The present invention is directed toward a neutralizing monoclonal antibody to hepatocyte growth factor, a phar-
ma-
ceutical composition comprising same, and methods of treatment comprising administering such a pharmaceutical composition to a
patient, such as for inhibiting glioblastoma.

MONOCLONAL ANTIBODIES TO HEPATOCYTE GROWTH FACTOR

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

5 [0001] This application is a continuation-in-part of U.S. Patent Application No. 10/825,060 filed April 15, 2004, which claims the benefit of the provisional application US Patent Application No. 60/464,061 filed April 18, 2003, both of which are incorporated by reference in their entirety for all purposes.

FIELD OF THE INVENTION

10 [0002] The present invention relates generally to the combination of monoclonal antibody (mAb) and recombinant DNA technologies for developing novel biologics, and more particularly, for example, to the production of monoclonal antibodies that bind to and neutralize Hepatocyte Growth Factor.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15 [0003] Human Hepatocyte Growth Factor (HGF) is a multifunctional heterodimeric polypeptide produced by mesenchymal cells. HGF has been shown to stimulate angiogenesis, morphogenesis and motogenesis, as well as the growth and scattering of various cell types (Bussolino *et al.*, J. Cell. Biol. 119: 629, 1992; Zarnegar and Michalopoulos, J. Cell. Biol. 129:1177, 1995; Matsumoto *et al.*, Ciba. Found. Symp. 212:198, 1997; Birchmeier and Gherardi, Trends Cell. Biol. 8:404, 1998; Xin *et al.* Am. J. Pathol. 158:1111, 2001). The pleiotropic activities of HGF are mediated through its receptor, a transmembrane tyrosine kinase encoded by the proto-oncogene cMet. In addition to regulating a variety of normal cellular functions, HGF and its receptor c-Met have been shown to be involved in the
20 initiation, invasion and metastasis of tumors (Jeffers *et al.*, J. Mol. Med. 74:505, 1996; Comoglio and Trusolino, J. Clin. Invest. 109:857, 2002). HGF/cMet are coexpressed, often over-expressed, on various human solid tumors including tumors derived from lung, colon, rectum, stomach, kidney, ovary, skin, multiple myeloma and thyroid tissue (Prat *et al.*, Int. J. Cancer 49:323, 1991; Chan *et al.*, Oncogene 2:593, 1988; Weidner *et al.*, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993; Derksen *et al.*, Blood 99:1405, 2002). HGF acts as an autocrine
30

(Rong *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4731, 1994; Koochekpour *et al.*, Cancer Res. 57:5391, 1997) and paracrine growth factor (Weidner *et al.*, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993) and anti-apoptotic regulator (Gao *et al.*, J. Biol. Chem. 276:47257, 2001) for these tumors.

- 5 [0004] HGF is a 102 kDa protein with sequence and structural similarity to plasminogen and other enzymes of blood coagulation (Nakamura *et al.*, Nature 342:440, 1989; Weidner *et al.*, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993, each of which is incorporated herein by reference) (Fig. 1). Human HGF is synthesized as a 728 amino acid precursor (preproHGF), which undergoes intracellular cleavage to an inactive, single chain form (proHGF)
- 10 (Nakamura *et al.*, Nature 342:440, 1989; Rosen *et al.*, J. Cell Biol. 127:1783, 1994). Upon extracellular secretion, proHGF is cleaved to yield the biologically active disulfide-linked heterodimeric molecule composed of an α -subunit and β -subunit (Nakamura *et al.*, Nature 342:440, 1989; Naldini *et al.*, EMBO J. 11:4825, 1992). The α -subunit contains 440 residues (69 kDa with glycosylation), consisting of the N-terminal hairpin domain and four kringle
- 15 domains. The β -subunit contains 234 residues (34 kDa) and has a serine protease-like domain, which lacks proteolytic activity. Cleavage of HGF is required for receptor activation, but not for receptor binding (Hartmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11574, 1992; Lokker *et al.*, J. Biol. Chem. 268:17145, 1992). HGF contains 4 putative N-glycosylation sites, 1 in the α -subunit and 3 in the β -subunit. HGF has 2 unique cell specific
- 20 binding sites: a high affinity ($K_d = 2 \times 10^{-10}$ M) binding site for the cMet receptor and a low affinity ($K_d = 10^{-9}$ M) binding site for heparin sulfate proteoglycans (HSPG), which are present on the cell surface and extracellular matrix (Naldini *et al.*, Oncogene 6:501, 1991; Bardelli *et al.*, J. Biotechnol. 37:109, 1994; Sakata *et al.*, J. Biol. Chem., 272:9457, 1997). NK2 (a protein encompassing the N-terminus and first two kringle domains of the α -subunit)
- 25 is sufficient for binding to cMet and activation of the signal cascade for motility, however the full length protein is required for the mitogenic response (Weidner *et al.*, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993). HSPG binds to HGF by interacting with the N terminus of HGF (Aoyama, *et al.*, Biochem. 36:10286, 1997; Sakata, *et al.*, J. Biol. Chem. 272:9457, 1997). Postulated roles for the HSPG-HGF interaction include the enhancement of HGF
- 30 bioavailability, biological activity and oligomerization (Bardelli, *et al.*, J. Biotechnol. 37:109, 1994; Zioncheck *et al.*, J. Biol. Chem. 270:16871, 1995).

[0005] cMet is a member of the class IV protein tyrosine kinase receptor family. The full length cMet gene was cloned and identified as the cMet proto-oncogene (Cooper *et al.*,

Nature 311:29, 1984; Park *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6379, 1987). The cMet receptor is initially synthesized as a single chain, partially glycosylated precursor, p170^(MBT) (Fig. 1) (Park *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6379, 1987; Giordano *et al.*, Nature 339:155, 1989; Giordano *et al.*, Oncogene 4:1383, 1989; Bardelli *et al.*, J. Biotechnol. 5 37:109, 1994). Upon further glycosylation, the protein is proteolytically cleaved into a heterodimeric 190 kDa mature protein (1385 amino acids), consisting of the 50 kDa α -subunit (residues 1-307) and the 145 kDa β -subunit. The cytoplasmic tyrosine kinase domain of the β -subunit is involved in signal transduction.

[0006] Several different approaches have been investigated to obtain an antagonistic molecule of the HGF/cMet interaction: truncated HGF proteins such as NK1 (N terminal domain plus kringle domain 1; Lokker *et al.*, J. Biol. Chem. 268:17145, 1993), NK2 (N 10 terminal domain plus kringle domains 1 and 2; Chan *et al.*, Science 254:1382, 1991) and NK4 (N-terminal domain plus four kringle domains; Kuba *et al.*, Cancer Res. 60:6737, 2000), anti-cMet mAbs (Dodge, Master's Thesis, San Francisco State University, 1998) and anti- 15 HGF mAbs (Cao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:7443, 2001, which is incorporated herein by reference).

[0007] NK1 and NK2 can compete effectively with the binding of HGF to its receptor, but have been shown to have partial agonistic activities *in vitro* (Cioce *et al.*, J. Biol. Chem. 271:13110, 1996; Schwall *et al.*, J. Cell Biol. 133:709, 1996), rather than purely antagonist 20 activities as desired. More recently, Kuba *et al.*, Cancer Res. 60:6737, 2000, demonstrated that NK4 could partially inhibit the primary growth (Fig. 2) and metastasis of murine lung tumor LLC in a nude mouse model by continuous infusion of NK4. The fact that NK4 had to administered continuously to obtain a partial growth inhibition of primary tumors indicates a potentially short half-life of the NK4 molecule and/or lack of potency. Compared to NK4, 25 the approach of using antibodies will benefit from their favorable pharmacokinetics and the possibility of obtaining antibodies with much higher potency.

[0008] As another approach, Dodge (Master's Thesis, San Francisco State University, 1998) generated antagonistic anti-cMet monoclonal antibodies (mAbs). One mAb, 5D5, exhibited strong antagonistic activity in ELISA, but induced a proliferative response of cMet- 30 expressing BAF-3 cells, presumably due to dimerization of the membrane receptors. Prat *et al.*, J. Cell Sci. 111:237, 1998, also reported such agonistic activities of anti-cMet mAbs. Zaccolo *et al.*, Eur. J. Immunol 27:618, 1997, used phage display methods to develop human

Fab fragments against mouse and human hepatocyte growth factor. These Fab fragments had no effect on the activity of HGF when used alone. When one of the anti-human HGF Fab fragments was combined with an antibody that bound to the Fab fragment itself, it actually enhanced the activity of HGF in a biological assay.

5 [0009] Cao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:7443, 2001, demonstrated that the administration of a cocktail of three anti-HGF mAbs, which were selected based upon their ability to inhibit the scattering activity of HGF *in vitro*, were able to inhibit the growth of human tumors in the xenograft nude mouse model (Fig. 3). They postulated that three mAbs recognizing three different binding sites on HGF were required to inhibit the bioactivities of HGF *in vivo*: two mAbs inhibited the binding of HGF to cMet and one mAb inhibited the
10 binding of HGF to heparin. However, it is impractical for commercial and regulatory reasons to develop a drug combining three novel mAbs, e.g., because some clinical activity of each antibody would need to be demonstrated independently.

[0010] Thus, there is a need for a single monoclonal antibody that blocks biological activity
15 of HGF *in vitro* and *in vivo*. The present invention fulfills this and other needs.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0011] In one embodiment, the invention provides a neutralizing mAb to human Hepatocyte Growth Factor (HGF). The mAb inhibits at least one, and preferably several or
20 all biological activities of HGF including binding to its receptor cMet, inducing scattering of cells such as Madin-Darby canine kidney cells, inducing proliferation of 4MBr-5 monkey epithelial cells and/or hepatocytes and/or HUVEC, and inducing angiogenesis. The Anti-HGF mAb can inhibit such an activity when used as a single agent. A preferred anti-HGF mAb inhibits, most preferably completely inhibits, growth of a human tumor xenograft in a
25 mouse. Preferably, the mAb of the invention is chimeric, humanized, human-like or human. Exemplary antibodies are L2G7 and its chimeric and humanized forms. Cell lines producing such antibodies are also provided. In another embodiment, a pharmaceutical composition comprising a neutralizing anti-HGF antibody, e.g., chimeric or humanized L2G7, is provided. In a third embodiment, the pharmaceutical composition is administered to a patient to treat
30 cancer or other disease.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0012] Figure 1. Schematic models of HGF and cMet.

[0013] Figure 2. Graph showing that NK4 partially inhibits the primary growth of murine lung tumor LLC in nude mice (from Kuba et al., Cancer Res. 60:6737, 2000). NK4 was
5 infused continuously for 14 days from 4th day after tumor implantation s.c. in nude mice.

[0014] Figure 3. Graph showing that a cocktail of three anti-HGF mAbs is required to inhibit the growth of human brain tumor U-118 cells in nude mice (from Cao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:7443, 2001). U-118 tumor cells were injected s.c. into nude mice. From day 1 anti-HGF mAbs A-1, -5, and -7, or mAbs 7-2 and -3 were administered at 200
10 µg/injection, twice/wk for 10 wks.

[0015] Figure 4. Determination of relative binding epitopes of mAbs L1H4, L2C7, L2G7 using competitive binding ELISA. Plates were coated with recombinant HGF (rHGF), blocked with skim milk and incubated with suboptimal concentration of biotinylated mAbs in the presence of 100x excess amounts of unlabeled mAbs. Biotinylated mAb bound was
15 detected by the addition of HRP-Streptavidin.

[0016] Figure 5. Binding of anti-HGF mAbs to rHGF as determined in a direct HGF binding ELISA. Plate was coated with the H1-F11 supernatant containing rHGF, blocked by 2% skim milk and incubated with mAbs, followed by the addition of HRP-GoMIgG (as described under Examples).

[0017] Figure 6. Abilities of anti-HGF mAbs to capture rHGF-Flag in solution. Anti-HGF mAbs were captured on a goat anti-mouse IgG coated ELISA plate. Plates were then blocked with 2% skim milk and incubated with rHGF-Flag, followed by HRP-M2 anti-Flag mAb (as described under Examples).

[0018] Figure 7. Inhibition of rHGF-Flag binding to cMet-Fc by anti-HGF mAbs in a capture ELISA. cMet-Fc captured on goat anti-human IgG coated plate is incubated with
25 HGF-Flag preincubated with/without mAbs. The bound rHGF-Flag was detected by the addition of HRP-M2 anti-Flag mAb (as described under Examples).

[0019] Figure 8. Neutralization of HGF induced MDCK scattering by anti-HGF mAb L2G7. (A) Control without any treatment. (B) rHGF + IgG. (C) rHGF + mAb L2G7.

MDCK cells were incubated with a 1:20 dilution of H1-F11 culture supernatant (~3 µg/ml of HGF) in the presence of 10 µg/ml of mAbs. Photos were taken at 100x magnification.
30

[0020] Figure 9. Inhibition of HGF-induced proliferation of Mv 1 LU cells by L2G7 mAb. The fold molar excess of mAb over HGF is shown on the horizontal axis, and the cpm $\times 10^{-2}$ incorporated is shown on the vertical axis. Data points were obtained in triplicate.

[0021] Figure 10. Inhibition of HGF-induced proliferation of HUVEC by L2G7 mAb and control mouse antibody (mIgG). Data points were obtained in triplicate.

[0022] Figure 11. Effect on HGF-induced proliferation of HCT 116 colon tumor cells by L2G7 and L1H4 antibodies. Data point were obtained in triplicate.

[0023] Figure 12. Effect of treatment with L2G7 mAb or PBS (control) on growth of U-118 tumors in groups of NIH III Beige/Nude mice ($n = 6$). Arrow indicates when injections began. (A) Tumor size vs day from tumor implantation. (B) Tumor mass at end of experiment.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0024] The invention provides neutralizing anti-HGF monoclonal antibodies, pharmaceutical compositions comprising them, and methods of using them for the treatment of disease.

1. Antibodies

[0025] Antibodies are very large, complex molecules (molecular weight of $\sim 150,000$ or about 1320 amino acids) with intricate internal structure. A natural antibody molecule contains two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one light chain and one heavy chain. Each light chain and heavy chain in turn consists of two regions: a variable ("V") region involved in binding the target antigen, and a constant ("C") region that interacts with other components of the immune system. The light and heavy chain variable regions fold up together in 3-dimensional space to form a variable region that binds the antigen (for example, a receptor on the surface of a cell). Within each light or heavy chain variable region, there are three short segments (averaging 10 amino acids in length) called the complementarity determining regions ("CDRs"). The six CDRs in an antibody variable domain (three from the light chain and three from the heavy chain) fold up together in 3-D space to form the actual antibody binding site which locks onto the target antigen. The position and length of the CDRs have been precisely defined. Kabat, E. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1983,

1987. The part of a variable region not contained in the CDRs is called the framework, which forms the environment for the CDRs.

[0026] A monoclonal antibody (mAb) is a single molecular species of antibody and therefore does not encompass polyclonal antibodies produced by injecting an animal (such as a rodent, rabbit or goat) with an antigen, and extracting serum from the animal. A humanized antibody is a genetically engineered (monoclonal) antibody in which the CDRs from a mouse antibody ("donor antibody", which can also be rat, hamster or other similar species) are grafted onto a human antibody ("acceptor antibody"). Humanized antibodies can also be made with less than the complete CDRs from a mouse antibody (e.g., Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002). Thus, a humanized antibody is an antibody having CDRs from a donor antibody and variable region framework and constant regions from a human antibody. Thus, typically a humanized antibody comprises (i) a light chain comprising three CDRs from a mouse antibody, e.g., L2G7, a variable region framework from a human antibody, and a human constant region, and (ii) a heavy chain comprising three CDRs from a mouse antibody, e.g., L2G7, a variable region framework from a human antibody and a human constant region. In addition, in order to retain high binding affinity, at least one of two additional structural elements can be employed. See, US Patent No. 5,530,101 and 5,585,089, each of which is incorporated herein by reference, which provide detailed instructions for construction of humanized antibodies.

[0027] In the first structural element, the framework of the heavy chain variable region of the humanized antibody is chosen to have maximal sequence identity (between 65% and 95%) with the framework of the heavy chain variable region of the donor antibody, by suitably selecting the acceptor antibody from among the many known human antibodies. Sequence identity is determined when antibody sequences being compared are aligned according to the Kabat numbering convention. In the second structural element, in constructing the humanized antibody, selected amino acids in the framework of the human acceptor antibody (outside the CDRs) are replaced with corresponding amino acids from the donor antibody, in accordance with specified rules. Specifically, the amino acids to be replaced in the framework are chosen on the basis of their ability to interact with the CDRs. For example, the replaced amino acids can be adjacent to a CDR in the donor antibody sequence or within 4-6 angstroms of a CDR in the humanized antibody as measured in 3-dimensional space.

12

[0028] A chimeric antibody is an antibody in which the variable region of a mouse (or other rodent) antibody is combined with the constant region of a human antibody; their construction by means of genetic engineering is well-known. Such antibodies retain the binding specificity of the mouse antibody, while being about two-thirds human. The proportion of nonhuman sequence present in mouse, chimeric and humanized antibodies suggests that the immunogenicity of chimeric antibodies is intermediate between mouse and humanized antibodies. Other types of genetically engineered antibodies that may have reduced immunogenicity relative to mouse antibodies include human antibodies made using phage display methods (Dower et al., WO91/17271; McCafferty et al., WO92/001047; Winter, WO92/20791; and Winter, FEBS Lett. 23:92, 1998, each of which is incorporated herein by reference) or using transgenic animals (Lonberg et al., WO93/12227; Kucherlapati WO91/10741, each of which is incorporated herein by reference).

[0029] As used herein, the term "human-like" antibody refers to a Mab in which a substantial portion of the amino acid sequence of one or both chains (e.g., about 50% or more) originates from human immunoglobulin genes. Hence, human-like antibodies encompass but are not limited to chimeric, humanized and human antibodies. As used herein, a "reduced-immunogenicity" antibody is one expected to have significantly less immunogenicity than a mouse antibody when administered to human patients. Such antibodies encompass chimeric, humanized and human antibodies as well as antibodies made by replacing specific amino acids in mouse antibodies that may contribute to B- or T-cell epitopes, for example exposed residues (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991). As used herein, a "genetically engineered" antibody is one for which the genes have been constructed or put in an unnatural environment (e.g., human genes in a mouse or on a bacteriophage) with the help of recombinant DNA techniques, and would therefore, e.g., not encompass a mouse mAb made with conventional hybridoma technology.

[0030] The epitope of a mAb is the region of its antigen to which the mAb binds. Two antibodies bind to the same or overlapping epitope if each competitively inhibits (blocks) binding of the other to the antigen. That is, a 1x, 5x, 10x, 20x or 100x excess of one antibody inhibits binding of the other by at least 50% but preferably 75%, 90% or even 99% as measured in a competitive binding assay compared to a control lacking the competing antibody (see, e.g., Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990, which is incorporated herein by reference). Alternatively, two antibodies have the same epitope if essentially all amino acid mutations in the antigen that reduce or eliminate binding of one antibody reduce or

eliminate binding of the other. Two antibodies have overlapping epitopes if some amino acid mutations that reduce or eliminate binding of one antibody reduce or eliminate binding of the other.

2. Neutralizing anti-HGF Antibodies

5' [0031] A monoclonal antibody (mAb) that binds HGF (i.e., an anti-HGF mAb) is said to neutralize HGF, or be neutralizing, if the binding partially or completely inhibits one or more biological activities of HGF (i.e., when the mAb is used as a single agent). Among the biological properties of HGF that a neutralizing antibody may inhibit are the ability of HGF to bind to its cMet receptor, to cause the scattering of certain cell lines such as Madin-Darby
10 canine kidney (MDCK) cells; to stimulate proliferation of (i.e., be mitogenic for) certain cells including hepatocytes, 4MBr-5 monkey epithelial cells, and various human tumor cells; or to stimulate angiogenesis, for example as measured by stimulation of human vascular endothelial cell (HUVEC) proliferation or tube formation or by induction of blood vessels when applied to the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). Antibodies of the
15 invention preferably bind to human HGF, i.e., to the protein encoded by the GenBank sequence with Accession number D90334 (incorporated by reference).

[0032] A neutralizing mAb of the invention at a concentration of, e.g., 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 or 50 µg/ml will inhibit a biological function of HGF (e.g., stimulation of proliferation or scattering) by about at least 50% but preferably 75%, more preferably by
20 90% or 95% or even 99%, and most preferably approximately 100% (essentially completely) as assayed by methods described under Examples or known in the art. Inhibition is considered complete if the level of activity is within the margin of error for a negative control lacking HGF. Typically, the extent of inhibition is measured when the amount of HGF used is just sufficient to fully stimulate the biological activity, or is 0.05, 0.1, 0.5, 1, 3 or 10 µg/ml.
25 Preferably, at least 50%, 75%, 90%, or 95% or essentially complete inhibition will be achieved when the molar ratio of antibody to HGF is 0.5x, 1x, 2x, 3x, 5x or 10x. Preferably, the mAb will be neutralizing, i.e., inhibit the biological activity, when used as a single agent, but possible 2 mAbs will be needed together to give inhibition. Most preferably, the mAb will neutralize not just one but several of the biological activities listed above; for purposes
30 herein, an anti-HGF mAb that used as a single agent neutralizes all the biological activities of HGF will be called "fully neutralizing", and such mAbs are most preferable. MAb of the invention will preferably be specific for HGF, that is they will not bind, or only bind to a

much lesser extent (e.g., K_a at least ten-fold less), proteins that are related to HGF such as fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF). Preferred antibodies lack agonistic activity toward HGF. That is, the antibodies block interaction of HGF with cMet without stimulating cells bearing HGF directly. MAbs of the invention typically have a binding affinity (K_a) for HGF of at least 10^7 M^{-1} but preferably 10^8 M^{-1} or higher, and most preferably 10^9 M^{-1} or higher or even 10^{10} M^{-1} or higher.

[0033] MAbs of the invention include anti-HGF antibodies in their natural tetrameric form (2 light chains and 2 heavy chains) and may be of any of the known isotypes IgG, IgA, IgM, IgD and IgE and their subtypes, i.e., human IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 and mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3. The mAbs of the invention are also meant to include fragments of antibodies such as Fv, Fab and F(ab')₂; bifunctional hybrid antibodies (e.g., Lanzavecchia *et al.*, Eur. J. Immunol. 17:105, 1987), single-chain antibodies (Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988; Bird *et al.*, Science 242:423, 1988); and antibodies with altered constant regions (e.g., U.S. Patent No. 5,624,821). The mAbs may be of animal (e.g., mouse, rat, hamster or chicken) origin, or they may be genetically engineered. Rodent mAbs are made by standard methods well-known in the art, comprising multiple immunization with HGF in appropriate adjuvant i.p., i.v., or into the footpad, followed by extraction of spleen or lymph node cells and fusion with a suitable immortalized cell line, and then selection for hybridomas that produce antibody binding to HGF, e.g., see under Examples. Chimeric and humanized mAbs, made by art-known methods mentioned *supra*, are preferred embodiments of the invention. Human antibodies made, e.g., by phage display or transgenic mice methods are also preferred (see e.g., Dower *et al.*, McCafferty *et al.*, Winter, Lonberg *et al.*, Kucherlapati, *supra*). More generally, human-like, reduced immunogenicity and genetically engineered antibodies as defined herein are all preferred.

[0034] The neutralizing anti-HGF mAbs L1H4, L2C7 and L2G7 mAbs described *infra* are examples of the invention, with L2G7 a preferred example. Neutralizing mAbs with the same or overlapping epitope as any of these mAbs, e.g., as L2G7, provide other examples. A chimeric or humanized form of L2G7 or with LGF is an especially preferred embodiment. A mAb (including chimeric, humanized and human antibodies) that competes with L2G7 for binding to HGF and neutralizes HGF in at least one, and preferably all, in vitro or in vivo assays described herein is also preferred. MAbs that are 90%, 95%, 99% or 100% identical (determined by aligning antibody sequences according to the Kabat convention) to L2G7 in amino acid sequence, at least in the CDRs are included in the invention. Preferably such

antibodies differ from L2G7 by a small number of functionally inconsequential amino acid substitutions (e.g., conservative substitutions), deletions, or insertions. Preferably such antibodies retain the functional properties of L2G7, i.e., such antibodies neutralize HGF in at least one, and preferably all, in vitro or in vivo assays described herein. For purposes of

5 classifying amino acids substitutions as conservative or nonconservative, amino acids may be grouped as follows: Group I (hydrophobic sidechains): norleucine, met, ala, val, leu, ile; Group II (neutral hydrophilic side chains): cys, ser, thr; Group III (acidic side chains): asp, glu; Group IV (basic side chains): asn, gln, his, lys, arg; Group V (residues influencing chain orientation): gly, pro; and Group VI (aromatic side chains): trp, tyr, phe. Conservative

10 substitutions involve substitutions between amino acids in the same class. Non-conservative substitutions constitute exchanging a member of one of these classes for a member of another.

[0035] Native mAbs of the invention may be produced from their hybridomas. Genetically engineered mAbs, e.g., chimeric or humanized mAbs, may be expressed by a variety of art-

15 known methods. For example, genes encoding their light and heavy chain V regions may be synthesized from overlapping oligonucleotides and inserted together with available C regions into expression vectors (e.g., commercially available from Invitrogen) that provide the necessary regulatory regions, e.g., promoters, enhancers, poly A sites, etc. Use of the CMV promoter-enhancer is preferred. The expression vectors may then be transfected using

20 various well-known methods such as lipofection or electroporation into a variety of mammalian cell lines such as CHO or non-producing myelomas including Sp2/0 and NS0, and cells expressing the antibodies selected by appropriate antibiotic selection. See, e.g., US Patent No. 5,530,101. Larger amounts of antibody may be produced by growing the cells in commercially available bioreactors.

25 [0036] Once expressed, the mAbs or other antibodies of the invention may be purified according to standard procedures of the art such as microfiltration, ultrafiltration, protein A or G affinity chromatography, size exclusion chromatography, anion exchange chromatography, cation exchange chromatography and/or other forms of affinity chromatography based on organic dyes or the like. Substantially pure antibodies of at least about 90 or 95%

30 homogeneity are preferred, and 98% or 99% or more homogeneity most preferred, for pharmaceutical uses.

3. Therapeutic Methods

[0037] In a preferred embodiment, the present invention provides a pharmaceutical formulation comprising the antibodies described herein. That is, the antibodies can be used in the manufacture of a medicament for treatment of disease. Pharmaceutical formulations (i.e., medicaments) of the antibodies contain the mAb in a physiologically acceptable carrier, optionally with excipients or stabilizers, in the form of lyophilized or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, or acetate at a pH typically of 5.0 to 8.0, most often 6.0 to 7.0; salts such as sodium chloride, potassium chloride, etc. to make isotonic; antioxidants, preservatives, low molecular weight polypeptides, proteins, hydrophilic polymers such as polysorbate 80, amino acids, carbohydrates, chelating agents, sugars, and other standard ingredients known to those skilled in the art (Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. 1980). The mAb is typically present at a concentration of 1 - 100 mg/ml, e.g., 10 mg/ml.

[0038] Antibodies of the invention are typically substantially pure from undesired contaminant. This means that the antibody is typically at least about 50% w/w (weight/weight) pure, as well as being substantially free from interfering proteins and contaminants. Preferably the antibodies are at least 90, 95% or 99% w/w pure. Pharmaceutical compositions for parenteral administration are usually sterile, substantially isotonic and prepared in accordance with Good Manufacturing Practices of the FDA or similar body.

[0039] In another preferred embodiment, the invention provides a method of treating a patient with a disease using an anti-HGF mAb in a pharmaceutical formulation. The mAb prepared in a pharmaceutical formulation can be administered to a patient by any suitable route, especially parentally by intravenous infusion or bolus injection, intramuscularly or subcutaneously. Intravenous infusion can be given over as little as 15 minutes, but more often for 30 minutes, or over 1, 2 or even 3 hours. The mAb can also be injected directly into the site of disease (e.g., a tumor), or encapsulated into carrying agents such as liposomes. The dose given will be sufficient to alleviate the condition being treated ("therapeutically effective dose") and is likely to be 0.1 to 5 mg/kg body weight, for example 1, 2, 3 or 4 mg/kg, but may be as high as 10 mg/kg or even 15 or 20 mg/kg. A fixed unit dose may also be given, for example, 50, 100, 200, 500 or 1000 mg, or the dose may be based on the

patient's surface area, e.g., 100 mg/m². Usually between 1 and 8 doses, (e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8) are administered to treat cancer, but 10, 20 or more doses may be given. The mAb can be administered daily, biweekly, weekly, every other week, monthly or at some other interval, depending, e.g. on the half-life of the mAb, for 1 week, 2 weeks, 4 weeks, 8 weeks, 3-6 months or longer. Repeated courses of treatment are also possible, as is chronic administration. A regime of a dosage and intervals of administration that alleviates or at least partially arrests the symptoms of the disease (biochemical, histologic and/or clinical), including its complications and intermediate pathological phenotypes in development of the disease is referred to as a therapeutically effective regime.

[0040] The pharmaceutical compositions of the invention can also be used in prophylaxis of a patient at risk of cancer. Such patients include those having genetic susceptibility to cancer, patients who have undergone exposure to carcinogenic agents, such as radiation or toxins, and patients who have undergone previous treatment for cancer and are at risk of recurrence. A prophylactic dosage is an amount sufficient to eliminate or reduce the risk, lessen the severity, or delay the outset of the disease, including biochemical, histologic and/or clinical symptoms of the disease, its complications and intermediate pathological phenotypes presenting during development of the disease. Administration of a pharmaceutical composition in an amount and at intervals effective to effect one or more of these objects is referred to as a prophylactically effective regime.

[0041] Diseases especially susceptible to therapy with the anti-HGF mAbs of this invention include solid tumors known or suspected to require angiogenesis or to be associated with elevated levels of HGF, for example ovarian cancer, breast cancer, lung cancer (small cell or non-small cell), colon cancer, prostate cancer, pancreatic cancer, renal cancer, gastric cancer, liver cancer, head-and-neck tumors, melanoma, sarcomas, and brain tumors (e.g., glioblastomas), of children or adults. Treatment can also be administered to patients having leukemias or lymphomas. In a preferred embodiment, the anti-HGF mAb can be administered together with (i.e., before, during or after) other anti-cancer therapy. For example, the anti-HGF mAb may be administered together with any one or more of the chemotherapeutic drugs known to those of skill in the art of oncology, for example Taxol (paclitaxel) or its derivatives, platinum compounds such as carboplatin or cisplatin, anthrocyclines such as doxorubicin, alkylating agents such as cyclophosphamide, anti-metabolites such as 5-fluorouracil, or etoposide. The anti-HGF mAb can be administered in combination with two, three or more of these agents in a standard chemotherapeutic regimen,

for example taxol and carboplatin, e.g. for breast and ovarian cancer. Other agents with which the anti-HGF mAb can be administered include biologics such as monoclonal antibodies, including Herceptin™ against the HER2 antigen, Avastin™ against VEGF, or antibodies to the EGF receptor, as well as small molecule anti-angiogenic or EGF receptor antagonist drugs. In addition, the anti-HGF mAb can be used together with radiation therapy or surgery.

[0042] Treatment (e.g., standard chemotherapy) including the anti-HGF mAb antibody may increase the median progression-free survival or overall survival time of patients with these tumors (e.g., ovarian, breast, lung, pancreas, brain and colon, especially when relapsed or refractory) by at least 30% or 40% but preferably 50%, 60% to 70% or even 100% or longer, compared to the same treatment (e.g., chemotherapy) but without anti-HGF mAb. In addition or alternatively, treatment (e.g., standard chemotherapy) including the anti-HGF mAb may increase the complete response rate, partial response rate, or objective response rate (complete + partial) of patients with these tumors (e.g., ovarian, breast, lung, pancreas, brain and colon, especially when relapsed or refractory) by at least 30% or 40% but preferably 50%, 60% to 70% or even 100% compared to the same treatment (e.g., chemotherapy) but without the anti-HGF mAb. Optionally, treatment can inhibit tumor invasion, or metastasis.

[0043] Typically, in a clinical trial (e.g., a phase II, phase II/III or phase III trial), the aforementioned increases in median progression-free survival and/or response rate of the patients treated with chemotherapy plus the anti-HGF mAb, relative to the control group of patients receiving chemotherapy alone (or plus placebo), will be statistically significant, for example at the $p = 0.05$ or 0.01 or even 0.001 level. It will also be understood by one of skill that the complete and partial response rates are determined by objective criteria commonly used in clinical trials for cancer, e.g., as listed or accepted by the National Cancer Institute and/or Food and Drug Administration.

4. Other Methods

[0044] The anti-HGF mAbs of the invention also find use in diagnostic, prognostic and laboratory methods. They may be used to measure the level of HGF in a tumor or in the circulation of a patient with a tumor, and therefore to follow and guide treatment of the tumor. For example, a tumor associated with high levels of HGF would be especially susceptible to treatment with an anti-HGF mAb. In particular embodiments, the mAbs can be used in an ELISA or radioimmunoassay to measure the level of HGF, e.g., in a tumor biopsy

specimen or in serum or in media supernatant of HGF-secreting cells in cell culture. The use of two anti-HGF mAbs binding to different epitopes (i.e., not competing for binding) will be especially useful in developing a sensitive "sandwich" ELISA to detect HGF. For various assays, the mAb may be labeled with fluorescent molecules, spin-labeled molecules, enzymes or radioisotopes, and may be provided in the form of kit with all the necessary reagents to perform the assay for HGF. In other uses, the anti-HGF mAbs will be used to purify HGF, e.g., by affinity chromatography.

EXAMPLES

1. Generation of Anti-HGF mAbs

[0045] To generate mAbs which bind to and block the activities of human HGF, recombinant human HGF (rHGF) was first produced in a mammalian expression system. cDNAs encoding the recombinant human HGF (rHGF) or rHGF-Flag peptide (8 amino acid residues of Flag attached to the c-terminus of HGF) were constructed in a pIND-inducible expression vector (No *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:3346, 1996). These cDNAs were then transfected into BcR-293 human kidney fibroblast cells (Invitrogen) using Fugene transfection reagent (Roche). Stable cell lines, H1-F11 and 24.1, secreting HGF and HGF-Flag respectively, were selected in the presence of 600 $\mu\text{g/ml}$ of G418 and 400 $\mu\text{g/ml}$ of Zeocin (Invitrogen). H1-F11 and 24.1 were induced to secrete HGF and HGF-Flag by treatment with 4 μM of Ponasterone A (Invitrogen) for 4-5 days in serum free DMEM containing glutamine and antibiotics. After aggregates were removed by centrifugation at 15,000 rpm for 30 min at 4°C, HGF secreted into the culture supernatant was concentrated approximately 100-fold using a membrane ultrafiltration cartridge with an MW 50,000 cut-off filter [Amicon Centriprep YM-50 filter followed by microcon YM-50 filter (Millipore)]. Such concentrated H1F11 culture supernatant contains ~100 $\mu\text{g/ml}$ of HGF and ~120 $\mu\text{g/ml}$ of bovine serum albumin.

[0046] Balb/c mice were immunized in each hind foot pad >10 times at one week intervals, with 1-2 μg of purified rHGF (Pepro Tech) or 1-2 μg of rHGF plus 1-2 μg of BSA (concentrated H1-F11 culture supernatant) resuspended in MPL-TDM (Ribi Immunochem. Research). Three days after the final boost, popliteal lymph node cells were fused with murine myeloma cells, P3X63AgU.1 (ATCC CRL1597), using 35% polyethylene glycol. Hybridomas were selected in HAT medium as described (Chuntharapai and Kim, J. Immunol. 163:766, 1997, which is incorporated herein by reference). Ten days after the

fusion, hybridoma culture supernatants were screened in a direct HGF binding ELISA as well as in an HGF-Flag capture ELISA. The latter assay was used to further confirm the specificity of anti-HGF mAbs selected using the direct HGF binding ELISA and to select mAbs that can bind to HGF in solution phase. Blocking activities of selected mAbs were then determined in the HGF-Flag/ cMet-Fc binding ELISA and in the MDCK scatter assay as described (Jeffers *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14417, 1998). Selected hybridomas were cloned twice using limiting dilution techniques. The isotype of mAbs were determined using an isotyping kit (Zymed). Ascites of selected mAbs were raised and purified using ImmunoPure (A/G) IgG Purification Kit (Pierce). Also biotinylated mAbs were prepared using EZ-sulfo-NHS-LC-Biotin according to the instructions provided by Pierce. Each of the assays referred to here is described in more detail below. For the direct HGF binding ELISA, microtiter plates (Maxisorb; Nunc) are coated with 50 μ l/well of H1-F11 culture supernatants containing rHGF, diluted in PBS at a 1:2 ratio of HGF/PBS, overnight at 4°C. After washing the plate, the nonspecific binding sites are blocked with PBS containing 2% skim milk for 1 hr at room temperature (RT). After washing the plate, 50 μ l/well of purified mAbs or hybridoma culture supernatants are added to each well for 1 hr. After washing, plates are then incubated with 50 μ l/well of 1 μ g/ml of HRP-goat anti-mouse IgG (HRP-G α MiGg, Cappel) for 1 hr. The bound HRP-G α MiGg is detected by the addition of the tetramethylbenzidine substrate (Sigma). The reaction is stopped by the addition of 1N H₂SO₄ and the plates are then read at 450 nm using an ELISA plate reader. Washes are carried out 3 times in wash buffer (PBS containing 0.05% Tween 20).

[0047] For the HGF-Flag capture ELISA, microtiter plates are coated with 50 μ l/well of 2 μ g/ml of goat antibodies specific to the Fc portion of mouse IgG (G α MiGg-Fc) in PBS overnight at 4°C and blocked with 2% skim milk for 1 hr at RT. After washing, the plates are incubated with 50 μ l/well of purified mAbs or hybridoma culture supernatants for 1 hr. After washing, plates are then incubated with 50 μ l/well of 24.1 cell culture supernatant containing rHGF-Flag. After washing, plates are then incubated with 50 μ l/well of HRP-M2 anti-Flag mAb (Invitrogen) in the presence of 15 μ g/ml of murine IgG. The bound HRP-anti-Flag M2 is detected by the addition of the substrate as described above. Washes are carried out 3 times in wash buffer.

[0048] At least three mAbs, designated L1H4, L2C7 and L2G7, obtained from hybridomas generated by immunizing the Balb/c mice with rHGF in concentrated H1-F11 culture

supernatant as described above, showed binding in both the direct rHGF binding ELISA and the HGF-Flag capture ELISA and were selected for further study. These hybridomas were then cloned twice, ascites were raised in mice by standard methods, and mAbs were purified using a protein G/A column. Their isotypes were determined using an isotyping kit (Zymed Lab). The L2G7 hybridoma has been deposited on April 29, 2003 with the American Type Culture Collection, P.O. Box 1549 Manassas, VA 20108, as ATCC Number PTA-5162 under the Budapest Treaty. These deposit will be maintained at an authorized depository and replaced in the event of mutation, nonviability or destruction for a period of at least five years after the most recent request for release of a sample was received by the depository, for a period of at least thirty years after the date of the deposit, or during the enforceable life of the related patent, whichever period is longest. All restrictions on the availability to the public of these cell lines will be irrevocably removed upon the issuance of a patent from the application.

[0049] Once a single, archtypal anti-human-HGF mAb, for example L2G7, has been isolated that has the desired properties described herein of neutralizing HGF in vitro and/or inhibiting (e.g., completely) tumor growth in vivo, it is straightforward to generate other mAbs with similar properties, by using art-known methods. For example, mice may be immunized with HGF as described above, hybridomas produced, and the resulting mAbs screened for the ability to compete with the archtypal mAb for binding to HGF.

Alternatively, the method of Jespers et al., *Biotechnology* 12:899, 1994, which is incorporated herein by reference, may be used to guide the selection of mAbs having the same epitope and therefore similar properties to the archtypal mAb, e.g., L2G7. Using phage display, first the heavy chain of the archtypal antibody is paired with a repertoire of (preferably human) light chains to select an HGF-binding mAb, and then the new light chain is paired with a repertoire of (preferably human) heavy chains to select a (preferably human) HGF-binding mAb having the same epitope as the archtypal mAb.

2. Characterization of Anti-HGF mAbs *In Vitro*

[0050] The binding epitopes of the antibodies were partially characterized by a competitive binding ELISA in which a 100x excess of unlabeled mAb was used to compete with the binding of the same or another biotinylated mAb in the HGF binding ELISA. Fig. 4 shows that the binding of the anti-HGF mAbs, L1H4 and L2G7, was inhibited only by themselves, suggesting that they recognize unique epitopes. The binding of L2C7 was inhibited by L2G7

but not by L1H4. This suggests that the L2C7 epitope overlaps with that of L2G7 but not of L1H4. However, L2C7 was not able to inhibit the binding of L2G7, suggesting that the L2C7 and L2G7 epitopes overlap but are distinct, and/or the affinity of L2C7 is much lower than that of L2G7. The epitopes of L1H4, L2C7 and L2G7 are respectively designated A, B and C.

[0051] The relative binding abilities of the three anti-HGF mAbs were measured using purified antibodies in the direct HGF binding ELISA, in which rHGF is first bound to the plate. In this assay, L2C7 and L2G7 bound better than L1H4 (Fig. 5). The ability of the mAbs to bind rHGF-Flag in solution was also determined, using the HGF-Flag capture ELISA. All three mAbs were able to capture rHGF-Flag in solution phase but mAb L2G7 was more effective than the others (Fig. 6). These results suggest that mAb L2G7 has the highest binding affinity to HGF among the three mAbs.

[0052] One of the biological activities of HGF is the ability to bind to its receptor cMet, so the ability of the anti-HGF mAbs to inhibit binding of HGF to cMET was assayed. For this assay, cMet-Fc was first produced by transfecting human fibroblast 293 cells with cDNA encoding residues 1-929 ECD of cMet linked with the Fc portion of human IgG1 (residues 216 to 446) as described by Mark *et al.*, J. Biol. Chem. 267:26166, 1992 in the pDisplay expression vector (Invitrogen). Microtiter plates are coated with 50 μ l/well of 2 μ g/ml of goat antibodies specific to the Fc portion of human IgG (GoaHIgG-Fc) in PBS overnight at 4°C and blocked with 2% BSA for 1 hr at RT. After washing the plates, 50 μ l of culture supernatant of 293 transfected with cMet-Fc cDNA is added to each well for 1 hr at RT. After washing the plates, 50 μ l/well of 24.1 cell culture supernatant containing rHGF-Flag, preincubated with various concentrations of mAbs, is added to each well for 1 hr. After washing, plates are then incubated with 50 μ l/well of HRP-M2 anti-Flag mAb (Invitrogen). The bound HRP-anti-Flag M2 is detected by the addition of the substrate as described above. Washes are carried out 3 times in wash buffer.

[0053] In this HGF-Flag/cMet-Fc binding inhibition assay, all three mAbs demonstrated some degrees of inhibition while an Ig control antibody did not (Fig. 7). MAb L2G7 at ≥ 1 μ g/ml and mAb L1H4 at 50 μ g/ml completely abolished the binding of rHGF-Flag to cMet-Fc; mAb L2C7 even at 50 μ g/ml gave only 85% inhibition. Hence, mAb L2G7 was much more potent in inhibiting the interaction of rHGF-Flag with cMet-Fc (and therefore

presumably HGF with its receptor cMet) than the other antibodies, consistent with its putatively greater affinity for HGF.

[0054] Since the receptor protein used in cMet-Fc/HGF-Flag binding ELISA is a soluble receptor protein, its conformation may be different from that of the natural membrane bound receptor. Furthermore, HGF binds to HSPG in addition to cMet and it is known that the HSPG-HGF interaction enhances various HGF activities. Thus, mAbs blocking the interaction of HGF with soluble cMet may not necessarily have the capacity to neutralize HGF bioactivities on the cells. Thus, it is important to further confirm the blocking activities of mAbs in selected biological systems. HGF is known to be a potent scattering factor. Thus, the neutralizing activity of the anti-HGF mAbs was also determined using the Madin-Darby canine kidney (MDCK cells obtained from ATCC) scatter assay as described (Jeffers *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14417, 1998). MDCK cells grown in DMEM supplemented with 5% FCS are plated at 10^3 cells/100 μ l/well in the presence of predetermined concentrations of rHGF with or without mAbs in DMEM with 5% FCS. After 2 days incubation at 37°C in 5% CO₂, cells are then washed in PBS, fixed in 2% formaldehyde for 10 min at RT. After washing in PBS cells are stained with 0.5% crystal violet in 50% ethanol (v/v) for 10 min at RT. Scattering activity is determined by microscopic examination.

[0055] Culture supernatant of the H1-F11 clone secreting HGF, described above, was used as the source of HGF in the scatter assay. As little as 1:80 dilution of H1-F11 culture supernatant induced the scattering and growth of MDCK cells. However, the scattering assays were carried out using a 1:20 dilution of H1-F11 culture supernatant (~3 μ g/ml). MAb L2G7 even at a 1:5 molar ratio of HGF/mAb inhibited the HGF induced scattering of MDCK by itself (Fig. 8), conclusively demonstrating that mAb L2G7 is indeed a neutralizing mAb. mAb L1H4 at ≥ 20 μ g/ml could also neutralize scattering of MDCK induced by HGF, while mAb L2C7 even at 20 μ g/ml gave only a partial neutralizing activity (data not shown).

[0056] The various characteristics of the three anti-HGF antibodies determined in the assays above are summarized in the Table 1.

Table 1. Characterization of mAbs to HGF

mAb	Isotype	Binding Epitope	Block HGF/ cMet-Fc binding	Block MDCK scattering
L1H4	G1, κ	A	Weak Block	+
L2C7	G2b, κ	B	Partial Block	+/-
L2G7	G2a, κ	C	Strong Block	+++

[0057] HGF is a member of the heparin binding growth factor family including fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF). Also, HGF has ~40% overall sequence similarity with plasminogen (Nakamura *et al.*, Nature. 342:440, 1989) and shares a similar domain structure with macrophage stimulating protein (MSF, Wang *et al.*, Scand. J. Immunol. 56:545, 2002). Thus, the binding specificity of the anti-HGF antibodies must be determined. The binding of anti-HGF mAbs to these HGF related proteins (available from R&D systems) is assayed using a direct binding ELISA similar to the one for HGF described above. MAb L2G7, mAb L2C7 and mAb L1H4 will not significantly bind to these proteins, demonstrating their specificity for HGF.

3. Ability of Anti-HGF MAbs to Inhibit Tumor-Promoting Biological Activities of HGF

[0058] HGF has a number of biological activities that make it likely that it plays a role in the growth and invasiveness of certain human tumors. One such activity of HGF is as a powerful mitogen for hepatocytes and other epithelial cells (Rubin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:415, 1991). Thus, to further prove the neutralizing activity of the anti-HGF mAbs, the effects of the mAbs on the HGF-induced proliferation of 4MBr-5 monkey epithelial cells (ATCC) or rat hepatocytes are determined. Hepatocytes are isolated according to a method described by Garrison and Haynes, J. Biol. Chem. 269:4264, 1985. Cells are resuspended at 5×10^4 cells/ml in DMEM containing 5% FCS and stimulated with a predetermined concentration of HGF with various concentration of mAbs. After 2½ days incubation at 37°C in 5% CO₂, the level of cell proliferation is determined by the addition of ³H-thymidine for 4 hrs. Cells are harvested using an automated cell harvester and the level of ³H-thymidine incorporated is determined on a scintillation counter. At sufficient concentrations, mAb L2G7 may largely or completely inhibit HGF-induced proliferation of

the cells, and mAbs L2C7 and L1H4 may at least partially inhibit proliferation. These antibodies may also inhibit the HGF-induced proliferation of other epithelial cell lines.

[0059] For example, the inhibitory activity of L2G7 on the HGF-induced proliferation of mink lung Mv 1 Lu cells was determined (Borset *et al.*, *J. Immunol. Methods* 189:59, 1996).

5 Cells grown in DMEM containing 10% FCS are harvested by treatment with EDTA/trypsin. After washing, the cells are resuspended at 5×10^4 cells/ml in serum free DMEM with a predetermined concentration (50 ng/ml) of HGF +/- various concentrations of mAb. After 1 day incubation at 37°C in 5% CO₂, the level of cell proliferation is determined by the addition of 1 μ Ci of ³H-thymidine for an additional 24 hr. Cells are harvested onto glass-fiber filters
 10 using an automated cell harvester and the level of ³H-thymidine incorporated is determined on a scintillation counter. Fig. 9 shows that the addition of 100-fold higher molar concentration of L2G7 mAb completely inhibited the proliferative response of Mv 1 Lu cells. Indeed, L2G7 even at a 3-fold molar ratio of mAb to HGF showed complete inhibition, while control IgG showed no inhibition even at 100-fold molar excess.

15 [0060] HGF is also reported to be a potent angiogenesis factor (Bussolino *et al.*, *J. Cell Biol.* 119:629, 1992; Cherrington *et al.*, *Adv. Cancer Res.* 79:1, 2000), and angiogenesis, the formation of new blood vessels, is believed to be essential to the growth of tumors. Therefore, the ability of the anti-HGF mAbs to inhibit the angiogenic properties of HGF is shown in three assays: (i) proliferation of human vascular endothelial cells (HUVEC), (ii)
 20 tube formation of HUVEC, and (iii) development of new blood vessels on the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). Since HGF has been shown to synergize with VEGF in angiogenesis (Xin *et al.*, *Am. J. Pathol.* 158:1111, 2001), these assays may be performed both in the presence and absence of VEGF.

[0061] The HUVEC proliferation assay is performed as described with a modification
 25 (Conn *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1323, 1990). HUVEC cells obtained from Clonetics are grown in Endothelial Growth Medium (EBM-2) containing 10% FCS plus endothelial cell growth supplements provided by Clonetics. Preferably cells from passages 4 to 7 are used in this study. The cells are resuspended to be 10^5 cells/ml in medium-199 containing antibiotics, 10 mM HEPES and 10% FCS (assay medium). HUVEC cells (50
 30 μ l/well) are added to microtiter wells containing a suitable concentration of HGF with various concentrations of anti-HGF mAbs for 1 hr at 37°C. After cells are incubated for 72 hr at 37°C in 5% CO₂, the level of cell proliferation is determined by incorporation of ³H-

thymidine for 4 hrs. At sufficient concentrations, mAb L2G7 will largely or completely inhibit HGF-induced proliferation of the HUVEC, and mAbs L2C7 and L1H4 may at least partially inhibit proliferation.

[0062] Alternatively, the level of cell proliferation may be determined by the well-known colorimetric MTT assay. The HUVECs (10^4 cells/100 μ l/well) are grown in serum free medium for 24 hr, and then incubated with 100 μ l of 50 ng/ml of HGF (predetermined to be a suboptimal amount) with various concentrations of mAb L2G7 for 72 hr. MTT solution (5 mg/ml) is added to each well (20 μ l/200 μ l medium) for 4 hr. Then 100 μ l medium /well is removed and mixed with 100 μ l/well of acidified isopropyl alcohol (0.04N HCl in isopropyl). The plates are read on an ELISA reader at 560 nm. The % maximum response is calculated as follows: [OD of HGF + mAb treated cells – OD of untreated cells] / [OD of HGF treated cells – OD of untreated cells] x 100. Fig 10 shows that even a 2-fold molar excess of L2G7 mAb largely blocks the proliferation of HUVEC in response to HGF.

[0063] The endothelial tube assay is carried out essentially as described (Matsumura, *et al.*, J. Immunol. 158: 3408, 2001; Xin *et al.*, Am. J. Pathol. 158:1111, 2001). HUVEC (Clonetics) from passage 4-7 are grown in Clonetics EGM medium supplemented with 10% FBS and endothelial cell growth supplements. Plates are coated with Matrigel (BD Biosciences) according to the manufacture's instructions at 37°C for 30 min, and the cells are seeded as 3×10^6 cells/ml in 1 x basal medium with HGF and various concentrations of anti-HGF mAbs. Tube formation is evaluated under microscope at low-power (10x) magnification. At sufficient concentrations, mAb L2G7 will largely or completely inhibit HGF-induced endothelial tube formation, and mAbs L2C7 and L1H4 may at least partially inhibit it.

[0064] The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay is performed essentially as described (Kim *et al.*, Nature 362:841, 1992). Three-day old chicken embryos are removed from their shells and grown in petri dishes in 5% CO₂ at 37°C. Seven days later, dried methylcellulose discs containing HGF with various concentrations of anti-HGF mAbs are layered onto the CAM. The methylcellulose discs are prepared by mixing 5 μ l of 1.5% methylcellulose in PBS with 5 μ l of HGF preincubated with mAbs. Three days later the development of blood vessels around methylcellulose discs are examined. At sufficient concentrations, mAb L2G7 will largely or completely inhibit such blood vessel formation, and mAbs L2C7 and L1H4 may at least partially inhibit it.

[0065] HGF is also reported to promote tumor growth (Comoglio and Trusolino, J. Clin. Invest. 109:857, 2002). The ability of the anti-HGF antibodies to inhibit this activity is shown in two steps. First, a number of tumor cell lines are examined for their ability to secrete HGF and proliferate in response to HGF since HGF may be an autocrine growth factor for some of these cells. These cell lines include a panel of human tumor cell lines known to express HGF and cMet (Koochekpour *et al.*, Cancer Res. 57:5391, 1997; Wang *et al.*, J. Cell Biol. 153:1023, 2001). Specific cell lines to be tested include U-118 glioma, HCT116 colon carcinoma, A549 lung carcinoma and A431 epidermoid carcinoma cells, all available from the ATCC. Once such tumor cell lines are identified, the effect of anti-HGF mAbs on the proliferative response to HGF of these cells is determined, using methods similar to those described above. At sufficient concentrations, mAb L2G7 will largely or completely inhibit HGF-induced proliferation of many or all of these cell lines, and mAbs L2C7 and L1H4 may at least partially inhibit proliferation.

[0066] For example, human HCT116 tumor cells are seeded into 96-well microtiter plates at 5×10^3 cells/well in 200 μ l of DMEM plus 5% FCS. After 24 hr incubation at 37°C in 5% CO₂, cells are washed with PBS and incubated in serum free DMEM for 48 hr. Cells are then incubated with 100 ng/ml of HGF +/- 20 μ g/ml of mAbs in DMEM for another 20 hr. As controls, cells grown in DMEM alone or DMEM plus 10% FCS are included. At the end of the incubation, levels of cell proliferation are determined by incorporation of ³H-thymidine for 4 hr. The result of such an experiment was carried out in triplicates is shown in Fig. 11. HGF induced a moderate proliferation of the HCT116 cells, which was completely abolished by addition of L2G7 antibody (but not by the less potent L1H4 antibody).

[0067] In all the assays described above, each anti-HGF antibody will neutralize or inhibit activity when used alone without other antagonists of HGF, i.e., as a single agent, but additive or synergistic effects may be achieved by administering the antibody in conjunction with other anti-HGF antibodies or other active agents.

4. Ability of anti-HGF mAbs to Inhibit Tumor Growth *In Vivo*

[0068] The ability of the anti-HGF antibodies to inhibit human tumor growth is demonstrated in xenograft models in immunodeficient mice or other rodents such as rat. Illustrative but not limiting examples of immunodeficient strains of mice that can be used are nude mice such as CD-1 nude, Nu/Nu, Balb/c nude, NIH-III (NIH-bg-nu-xid BR); scid mice such as Fox Chase SCID (C.B-17 SCID), Fox Chase outbred SCID and SCID Beige; mice

deficient in RAG enzyme; as well as nude rats. Experiments are carried out as described previously (Kim *et al.*, Nature 362:841, 1992, which is incorporated herein by reference). Human tumor cells grown in complete DMEM medium are harvested in HBSS. Female immunodeficient, e.g., athymic nude mice (4-6 wks old) are injected s.c. with typically 5×10^6 cells in 0.2 ml of HBSS in the dorsal areas. When the tumor size reaches 50-100 mm³, the mice are grouped randomly and appropriate amounts of the anti-HGF and control mAbs (typically between 0.1 and 1.0 mg, e.g. 0.5 mg) are administered i.p. once, twice or three times per week in a volume of, e.g., 0.1 ml, for e.g., 1, 2, 3, or 4 weeks or the duration of the experiment. Tumor sizes are determined typically twice a week by measuring in two dimensions [length (a) and width (b)]. Tumor volume is calculated according to $V = ab^2/2$ and expressed as mean tumor volume $\pm$ SEM. The number of mice in each treatment group is at least 3, but more often between 5 and 10, e.g., 7. Statistical analysis may be performed using, e.g., Student's t test. In a variation of this experiment, administration of the antibody begins simultaneously or shortly after injection of the tumor cells. The effect of the antibody may also be measured by prolongation of the survival of the mice, or increase in percent of the mice surviving.

[0069] Various tumor cell lines known to secrete or respond to HGF are used in separate experiments, for example U118 human glioblastoma cells, and/or HCT116 human colon tumor cells. Preferred antibodies of the invention, such as human-like and reduced-immunogenicity antibodies and the L2G7 antibody and its chimeric and humanized forms and antibodies with the same epitope as L2G7, when used as a single agent, will inhibit growth of tumors by at least 25%, but possibly 40% or 50%, and as much as 75% or 90% or greater, or even completely inhibit tumor growth after some period of time or cause tumor regression or disappearance. This inhibition will take place for at least tumor cell line such as U118 in at least one mouse strain such as NIH III Beige/Nude, but preferably will occur for 2, 3, several, many, or even essentially all HGF-expressing tumor cell lines of a particular (e.g., glioma) or any type, when tested in one or more immunodeficient mouse strains that do not generate a neutralizing antibody response against the injected antibody. Treatment with some preferred antibodies in one or more of the xenograft models leads to the indefinite survival of 50%, 75%, 90% or even essentially all mice, who would otherwise die or need to be sacrificed because of growth of their tumor.

[0070] For example, such an experiment was performed with U-118 glioblastoma cells, grown in DMEM medium with FCS and harvested in HBSS. Female NIH III Beige/Nude

19
mice (4-6 wks old) are injected s.c. with 10^6 cells in 0.2 ml of HBSS in the dorsal areas. When the tumor size reaches $\sim 50 \text{ mm}^3$, the mice are grouped randomly into 2 groups of 6 mice each, and 200 μg of the L2G7 mAb (treatment group) or of PBS (control group) are given i.p. twice a week in a volume of 0.1 ml. Tumor sizes are determined twice a week as described above. At the end of the experiment, the tumors are excised and weighed. Fig. 12 shows that treatment with L2G7 completely inhibited tumor growth.

[0071] Similar tumor inhibition experiments are performed with the anti-HGF antibody administered in combination one or more chemotherapeutic agents such as 5-FU (5-fluorouracil) or CPT-11 (Camptosar) to which the tumor type is expected to be responsive, as described by Ashkenize *et al.*, J. Clin. Invest. 104:155, 1999. The combination of the antibody and chemotherapeutic drug may produce a greater inhibition of tumor growth than either agent alone. The effect may be additive or synergistic, and strongly inhibit growth, e.g. by 80% or 90% or more, or even cause tumor regression or disappearance. The anti-HGF antibody may also be administered in combination with an antibody against another growth or angiogenic factor, for example anti-VEGF, and additive or synergistic growth inhibition and/or tumor regression or disappearance is expected.

[0072] Although the invention has been described with reference to the presently preferred embodiments, it should be understood that various modifications can be made without departing from the invention. Unless otherwise apparent from the context any step, element, embodiment, feature or aspect of the invention can be used with any other.

[0073] All publications, patents and patent applications cited are herein incorporated by reference in their entirety for all purposes to the same extent as if each individual publication, patent and patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference in its entirety for all purposes.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A monoclonal antibody (mAb) that binds and neutralizes human Hepatocyte Growth Factor (HGF).
2. The mAb of claim 1 which is chimeric.
3. The mAb of claim 1 which is humanized.
4. The mAb of claim 1 which is human.
5. The mAb of claim 1 which inhibits binding of HGF to cMet by at least 50%.
6. The mAb of claim 1 which inhibits HGF-induced scattering of Madin-Darby canine kidney cells.
7. The mAb of claim 1 which inhibits HGF-induced proliferation of HUVEC cells.
8. The mAb of claim 1 which inhibits HGF-induced angiogenesis.
9. The mAb of claim 1 which neutralizes all biological activities of HGF.
10. The mAb of claim 1 which inhibits growth of a human tumor xenograft in a mouse.

11. The mAb of claim 10 which completely inhibits growth of a human tumor xenograft in a mouse.
12. The mAb of claim 1 which is a Fab or F(ab')₂ fragment or single-chain antibody.
13. The mAb of claim 1 which specifically binds HGF with a binding affinity of at least 10^8 M^{-1} .
14. A chimeric or humanized L2G7 mAb.
15. An antibody that competes for binding to human HGF with an antibody of claim 14.
16. A cell line producing a mAb of claim 1.
17. A pharmaceutical composition comprising a mAb of claim 14.
18. A method of treating cancer in a patient comprising administering to the patient a pharmaceutical composition comprising a neutralizing anti-HGF mAb.
19. A method of claim 18 wherein said cancer is glioblastoma.
20. The method of claim 18 wherein said mAb is a chimeric or humanized L2G7 mAb.

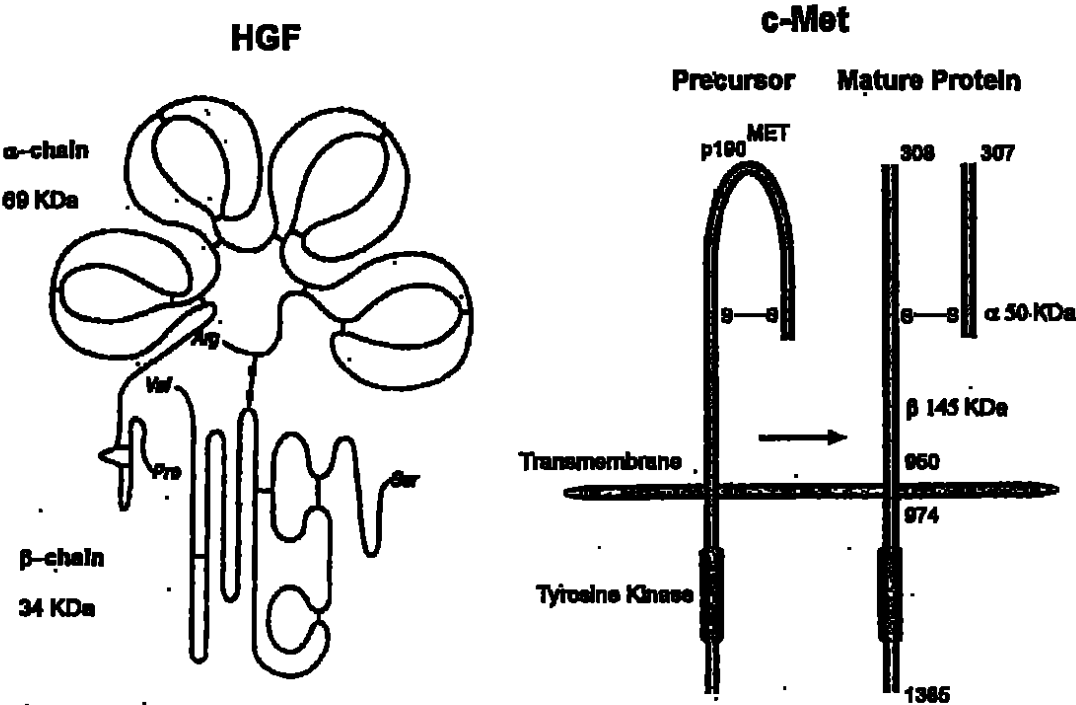


FIGURE 1

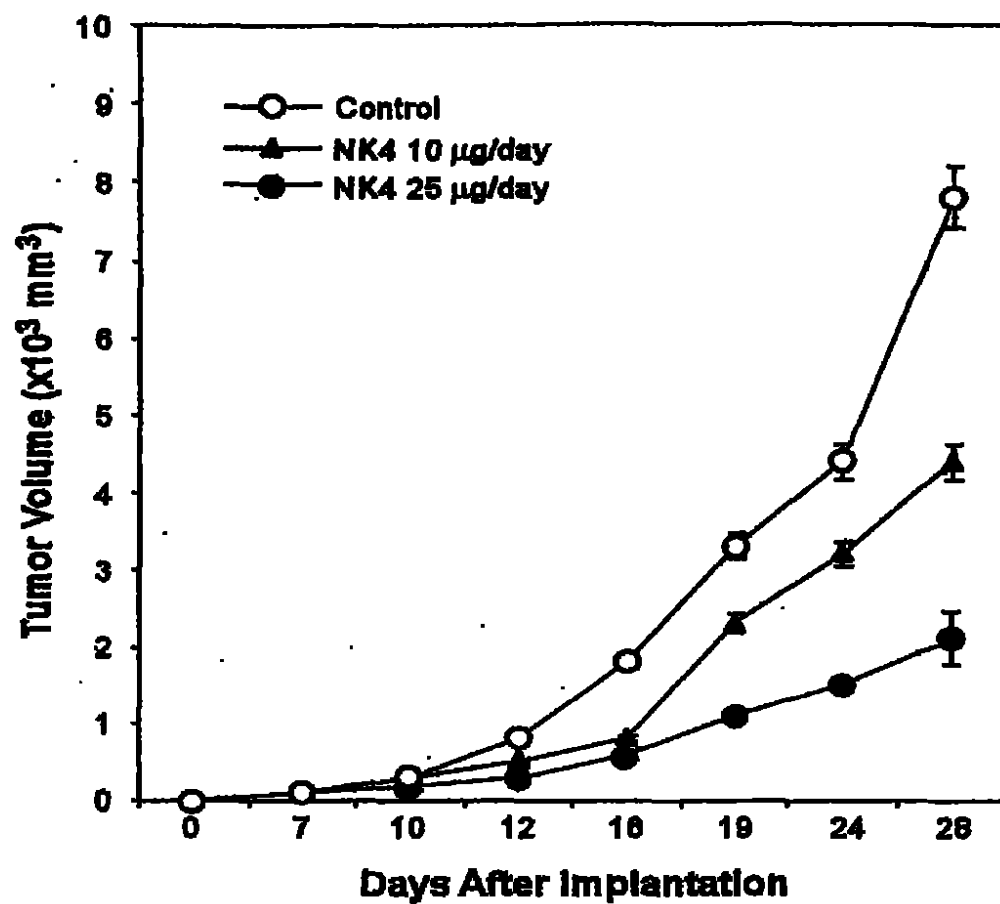


FIGURE 2

25

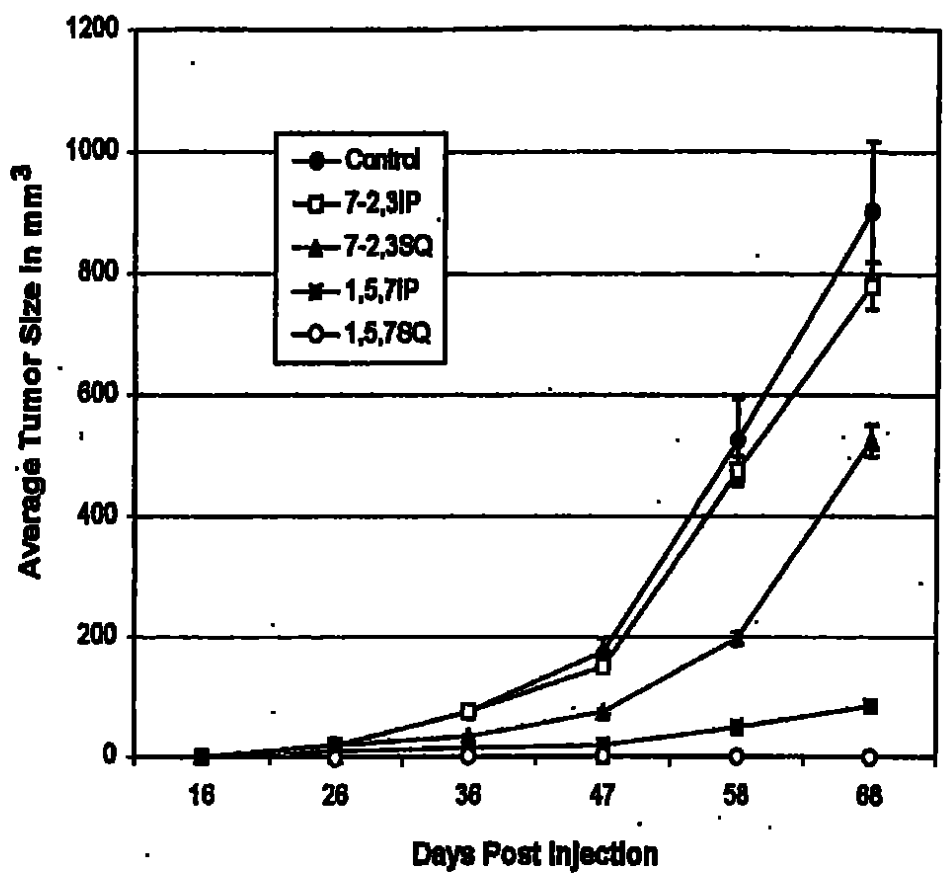


FIGURE 3

38

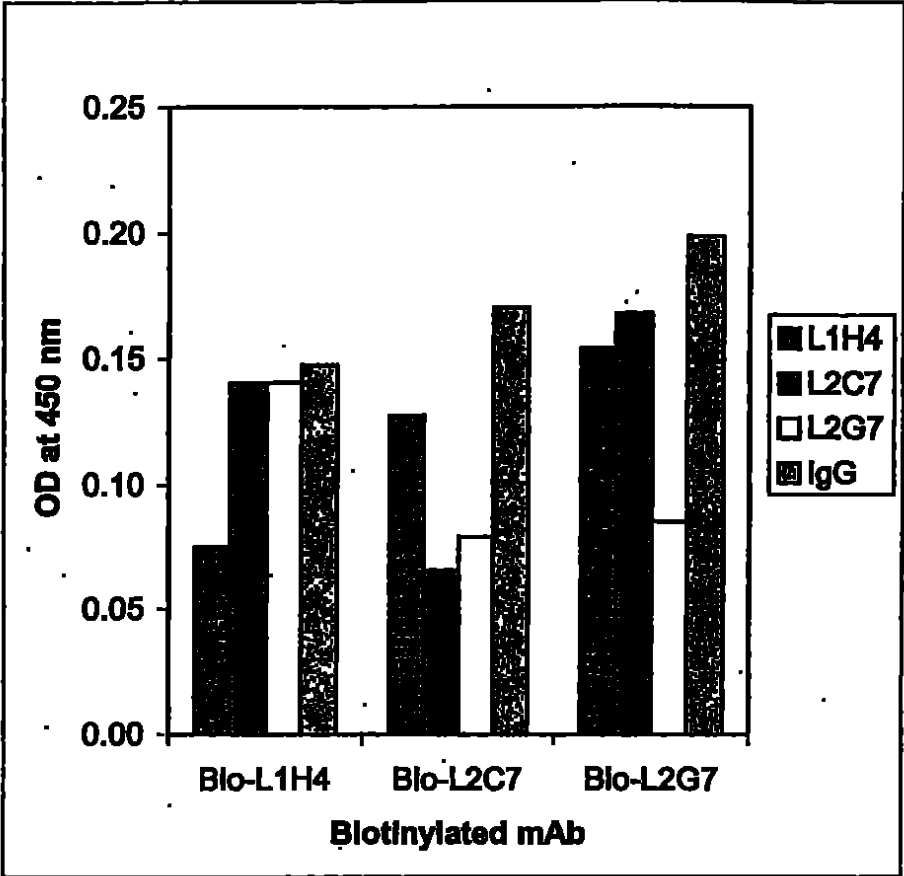


FIGURE 4

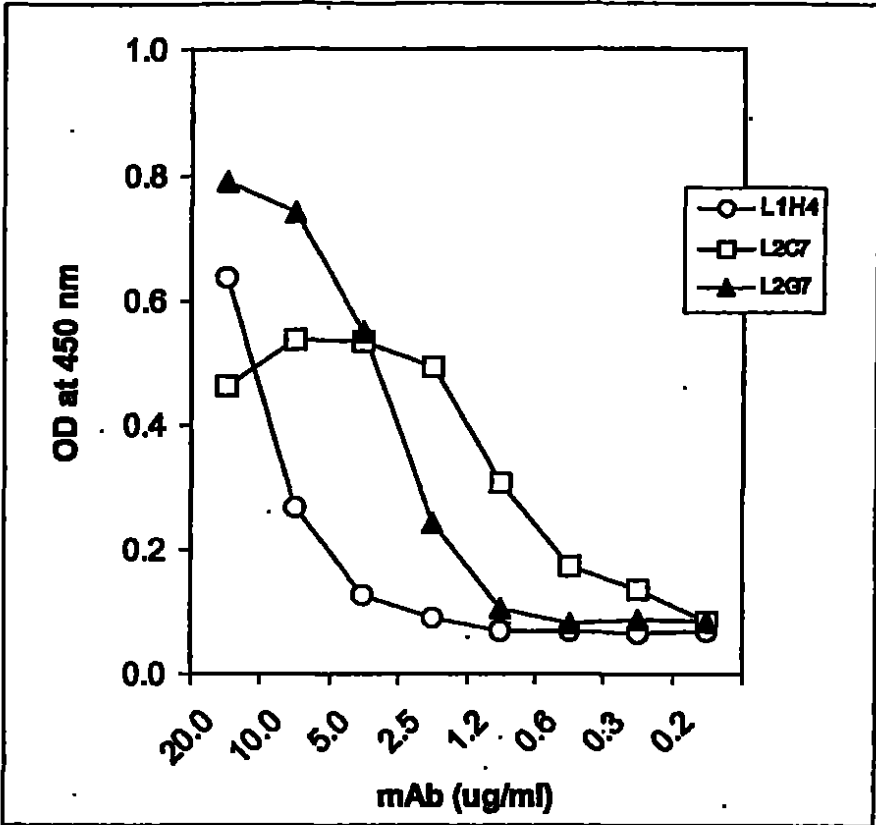


FIGURE 5

23

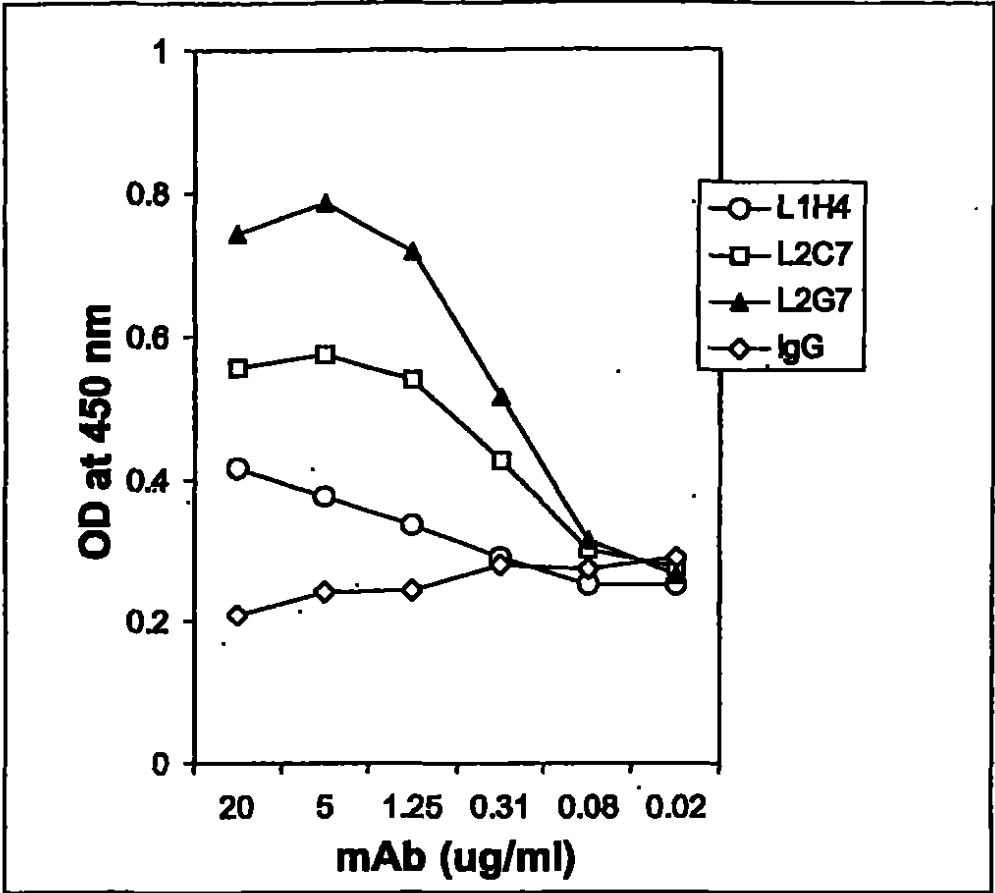


FIGURE 6

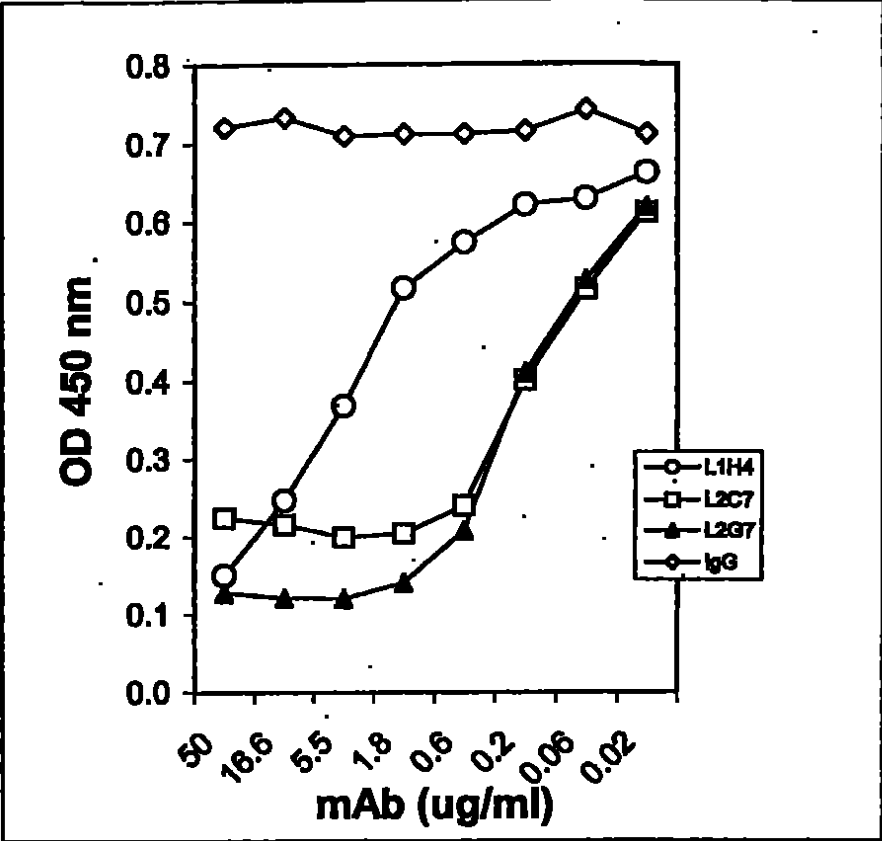


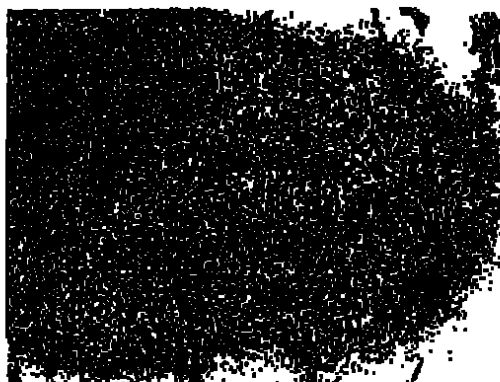
FIGURE 7

A



NONE

B



HGF + IgG

C



HGF + L2G7

FIGURE 8

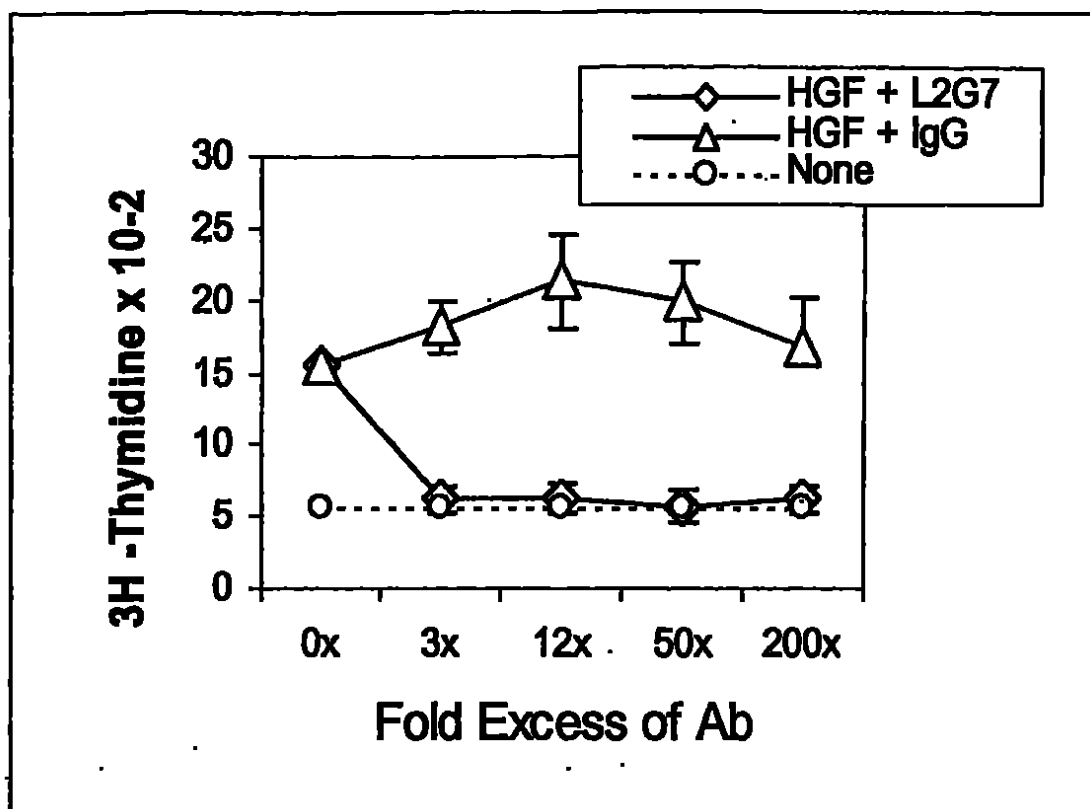


FIGURE 9

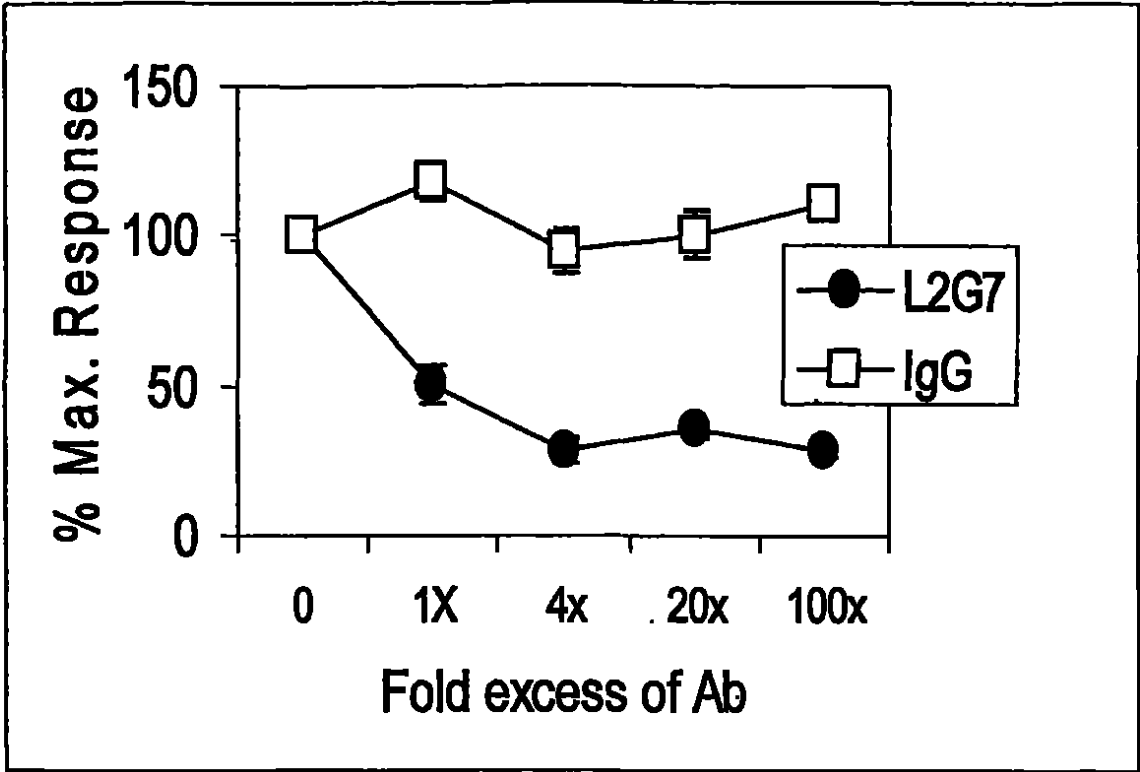


FIGURE 10

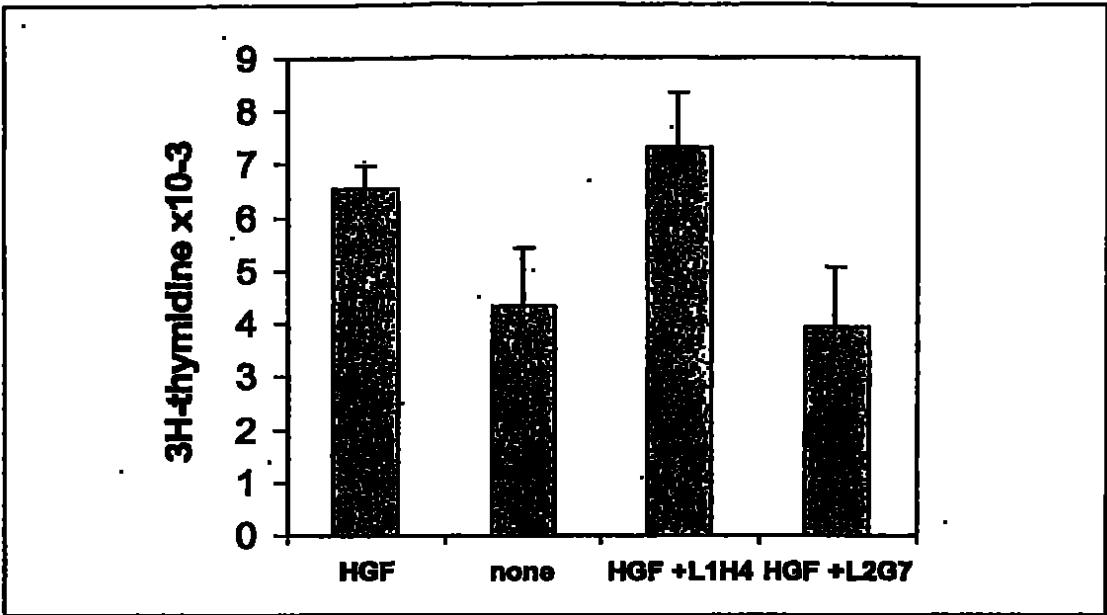


FIGURE 11

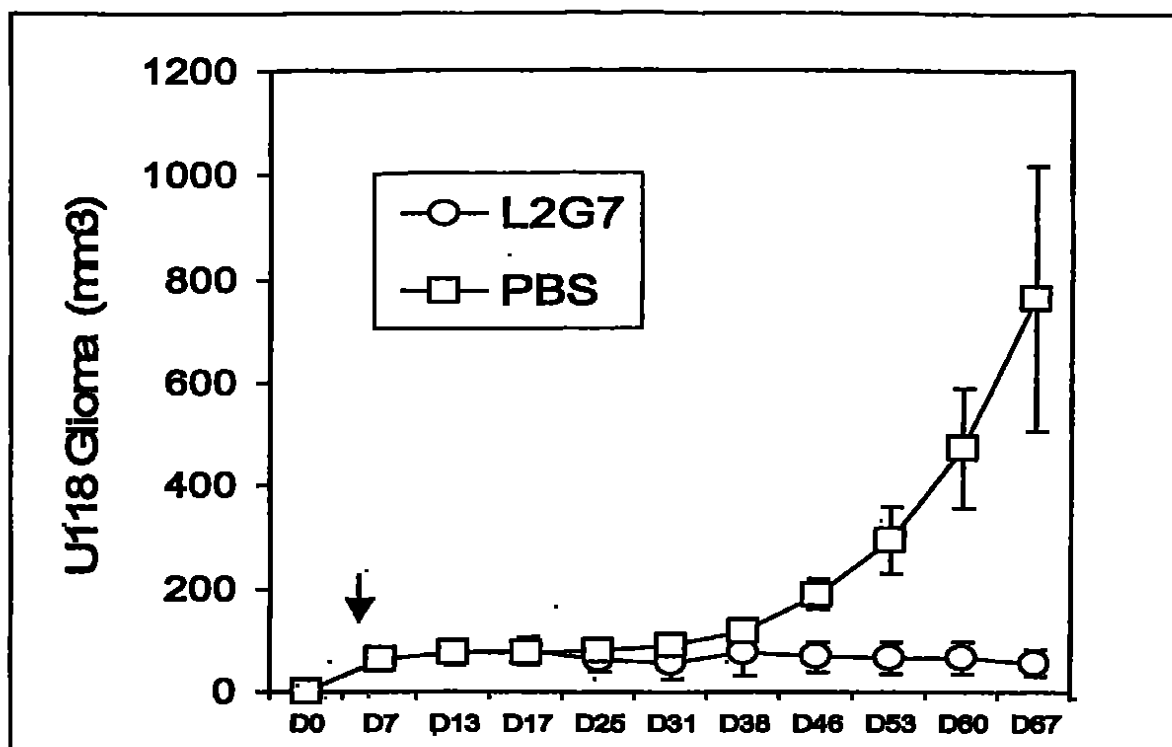
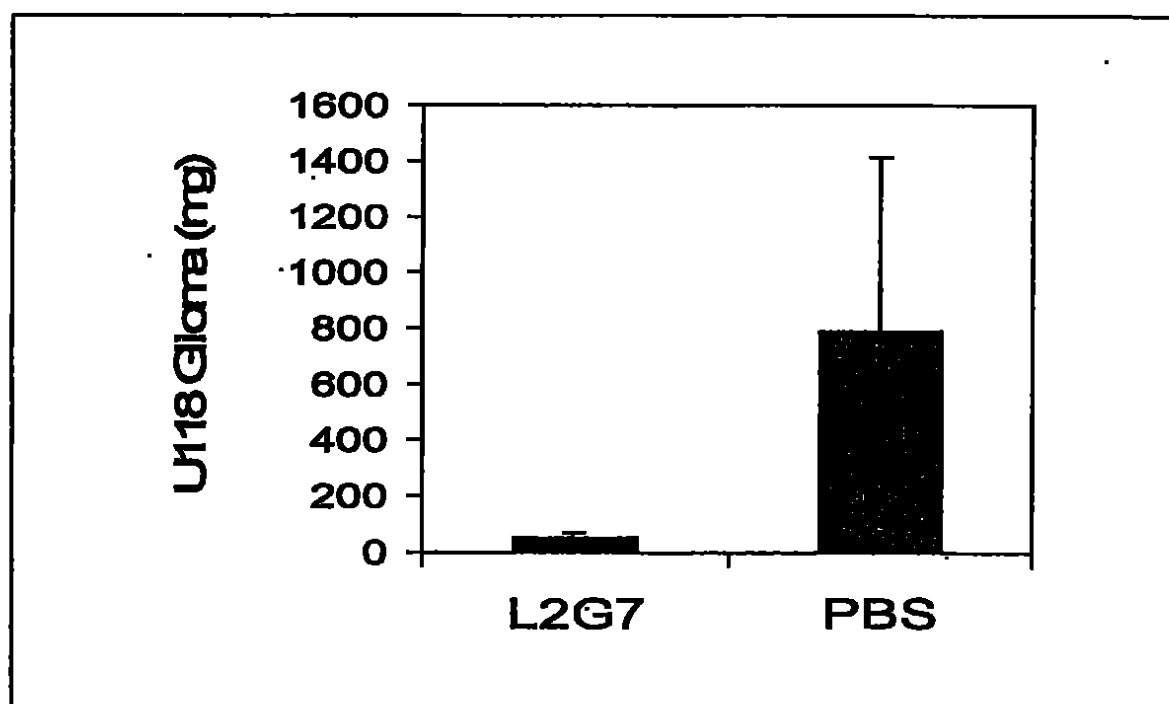
A**B**

FIGURE 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/26565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 39/395; C07K 16/22; C12N 5/20; G01N 33/53, 33/563, 33/574, 33/577

US CL. : 424/145.1, 152.1, 156.1; 435/7.1, 335, 336, 344.1; 436/503, 512; 530/387.3, 388.23, 388.24, 388.85

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/145.1, 152.1, 156.1; 435/7.1, 70.21, 452, 335, 336, 344.1; 436/503, 512, 548; 530/387.3, 388.23, 388.24, 388.85

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	BURR et al. Anti-Hepatocyte Growth Factor Antibody Inhibits Hepatocyte Proliferation During Liver Regeneration. <i>Journal of Pathology</i> . 1998, Vol. 185, No. 3, pages 298-302, see entire document.	1,16 1-13,15,16,18,19
X — Y	DI NICOLA et al. Human Bone Marrow Stromal Cells Suppress T-Lymphocyte Proliferation Induced by Cellular or Nonspecific Mitogenic Stimuli. <i>Blood</i> . 15 May 2002, Vol. 99, No. 10, pages 3838-3843, see especially pages 3839, col. 2, and 3842, col. 1.	1,16 1-13,15,16,18,19
Y	CAO et al. Neutralizing Monoclonal Antibodies to Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF) Display Antitumor Activity in Animal Models. <i>Proceedings of the National Academy of Science USA</i> . 19 June 2001, Vol. 98, No. 13, pages 7443-7448, see entire document.	1-13,15,16,18,19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"A" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

02 December 2004 (02.12.2004)

Date of mailing of the international search report

07 JAN 2005

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

James L. Crum

Telephone No. 571-272-1600

55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/26563

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST, DIALOG
search terms: hepatocyte growth factor, HGF, neutraliz?, monoclonal, antibody?

ANTICUERPOS MONOCLONALES AL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención es concerniente en general con la combinación de anticuerpo monoclonal (mAb) y tecnologías de ADN recombinantes para desarrollar nuevos compuestos biológicos y más en particular, por ejemplo a la producción de anticuerpos monoclonales que se enlazan a y neutralizan el factor de crecimiento de hepatocito.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En factor de crecimiento de hepatocito humano (HGF) es un polipéptido heterodimérico multifuncional producido por células mesenquimales. Se ha demostrado que el HGF estimula la angiogénesis, morfogénesis y mitogenesis, también como el crecimiento y dispersión de varios tipos de células (Bussolino et al., J. Cell. Biol. 119:629, 1992; Zarnegar and Michalopoulos, J. Cell. Bio. 129:1177, 1995; Matsumoto et al., Ciba. Found. Symp. 212:198, 1997; Birchmeier y Gherardi, Trends Cell. Biol. 8:404, 1998; Xin et al. Am. J. Pathol. 158:1111, 2001). Las actividades pleiotrópicas de HGF son moderadas por medio de su receptor, una tirosina quinasa de transmembrana codificada por el proto-oncogen cMet. Además de regular una variedad de funciones celulares normales el HGF y su receptor c-Met han demostrado estar involucrados en el inicio, invasión y metástasis de tumores (Jeffers et al., J. Mol. Med. 74:505,

25

1996; Comoglio y Trusolino, J. Clin. Invest. 109:857, 2002). HGF/cMet son co-expresados, frecuentemente sobreexpresados sobre varios tumores sólidos humanos en los que se incluyen tumores derivado de pulmón, colon, recto, estómago, riñón, ovario, piel, mieloma múltiple y tejido tiroides (Prat et al., Int. J. Cancer 49:323, 1991; Chan et al., Oncogen 2:593, 1988, Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993; Derksen et al., Blood 99:1405, 2002). HGF actúa como un factor de crecimiento autocrino (Rong et al., Proc. Nacional. Acad. Sci. EUA 91:4731, 1994; Koochekpour et al., Cancer Res. 57:5391; 1997) y paracrino (Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993) y regulador anti-apoptótico (Gao et al., J. Biol. Chem. 276:47257, 2001) para estos tumores.

HGF es una proteína de 102 kDa con secuencia y similaridad estructural al plasminógeno y otras enzimas de la coagulación de la sangre (Nakamura et al., Nature 342:440, 1989; Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993, cada una de las cuales es incorporada en la presente por referencia) (Figura 1). El HGF humano es sintetizado como un precursor de 728 aminoácidos (preproHGF), que sufre escisión intracelular a una forma de una sola cadena inactiva (proHGF) (Nakamura et al., Nature 342:440, 1989; Rosen et al., J. Cell. Biol. 127:1783, 1994). En la secreción extracelular, el proHGF es escindido para producir la molécula heterodimérica disulfuro-enlazada biológicamente activa compuesta de una α -

47 2

subunidad y β -subunidad (Nakamura et al., Nature 342:440, 1989; Naldini et al., EMBO J. 11:4825, 1992). La α -subunidad contiene 440 residuos (69 kDa con glicosilación), que consiste del dominio de horquilla N-terminal y cuatro dominios kringle. La

5 β -subunidad contiene 234 residuos (34 kDa) y tiene un dominio semejante a serina proteasa, que carece de actividad proteolítica. La escisión de HGF es requerida para la activación del receptor, pero no para el enlace del receptor (Hartmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 89:11574, 1992;

10 Lokker et al., J. Biol. Chem. 268:17145, 1992). HGF contiene 4 sitios de N-glicosilación supuestos, 1 en la α -subunidad y 3 en la β -subunidad. El HGF tiene dos sitios de enlace específico de célula únicos: un sitio de enlace de alta afinidad ($K_d = 2 \times 10^{-10}$ M) para el receptor cMet y un sitio de enlace de baja

15 afinidad ($K_d = 10^{-9}$ M) para proteoglicanos de sulfato heparina (HSPG), que están presentes sobre la superficie celular y matriz extracelular (Naldini et al., Oncogene 6:501, 1991; Bardelli et al., J. Biotechnol. 37:109, 1994; Sakata et al., J. Biol. Chem., 272:9457, 1999). NK2 (una proteína que abarca el N-

20 término y primeros dos dominios kringle de la α -subunidad) es suficiente para el enlace a cMet y activación de la cascada de señal para movilidad, sin embargo la proteína de plena longitud es requerida para la respuesta mitogénica (Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993). HSPG se enlace al HGF

al interactuar con el término N de HGF (Aoyama, et al., Biochem. 36:10286, 1997; Sakata, et al., J. Biol. Chem. 272:9457, 1997). Las funciones postuladas para la interacción HSPG-HGF incluyen la mejora de la biodisponibilidad de HGF, actividad biológica y oligomerización (Bardelli, et al., J. Biotechnol. 37:109, 1994; Zioncheck et al., J. Biol. Chem. 270:16871, 1995).

cMet es un elemento de la familia de receptor de proteína tirosina quinasa clase IV. El gen cMet de plena longitud fue clonado e identificado como el proto-oncógeno cMet (Cooper, et al., Nature 311:29, 1984; Park et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 84:6379, 1987). El receptor cMet es sintetizado inicialmente como un precursor de una sola cadena, parcialmente glicosilado, p170^(MET) (figura 1) (Park et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 84:6379, 1987; Giordano et al., Nature 339:155, 1989; Giordano et al., Oncogene 4:1383, 1989; Bardelli et al., J. Biotechnol. 37:109, 1994). Después de la glicosilación adicional, la proteína es escindida proteolíticamente a una proteína madura de 190 kDa heterodimérica (1385 aminoácidos), que consiste de la α -subunidad de 50 kDa (residuos 1-307) y la β -subunidad de 145 kDa. El dominio de tirosina quinasa citoplásmica de la β -subunidad está involucrado en la transducción de señal.

Varios procedimientos diferentes han sido investigados para obtener una molécula antagónica de la

interacción HGF/cMet: proteínas HGF truncadas tales como NK1 (dominio N terminal más dominio kringle 1; Lokker et al., J. Biol. Chem. 268:17145, 1993), NK2 (dominio N terminal más dominios kringle 1 y 2; Chan et al., Science 254:1382, 1991) y 5 NK4 (dominio N-terminal más cuatro dominios kringle; Kuba et al., Cancer Res. 60:6737, 2000), mAbs anti-cMet (Dodge, Master's Thesis, San Francisco State University, 1998 y mAbs anti-HGF (Cao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 98:7443, 2001, que es incorporado en la presente por referencia).

10 NK1 y NK2 pueden competir efectivamente con el enlace de HGF a su receptor, pero han demostrado tener actividades agonistas parciales in vitro (Cioce et al., J. Biol. Chem. 271:13110, 1996; Schwall et al., J. Cell. Biol. 133:709, 1996), en lugar de actividades puramente antagonistas como se desea. 15 Más recientemente, Kuba et al., Cancer Res. 60:6737, 2000, demostraron que NK4 podría inhibir parcialmente el crecimiento primario (figura 2) y metástasis de tumor de pulmón murino LLC en un modelo de ratón desnudo mediante infusión continua de NK4. El hecho que NK4 se tiene que administrar continuamente 20 para obtener una inhibición de crecimiento parcial de tumores primarios indica una vida media potencialmente corta de la molécula NK4 y/o carencia de potencia. En comparación con NK4, el procedimiento de utilizar anticuerpos se beneficiará de su farmacocinética favorable y la posibilidad de obtener 25 anticuerpos con potencia mucho más alta.

Como otro procedimiento, Dodge (Master's Thesis, San Francisco State University, 1998) generó anticuerpos (mAbs) monoclonales anti-cMet antagónicos. Un mAb, 5D5, exhibió fuerte actividad antagónica en ELISA, pero indujo una respuesta proliferativa de cMet que expresa células BAF-3, supuestamente debido a la dimerización de los receptores de membrana. Prat et al., J. Cell. Sci. 111:237, 1998, también reportaron tales actividades antagonistas de mAbs anti-cMet. Zaccolo et al., Eur. J. Immunol 27:618, 1997, usaron métodos de exhibición de fago para desarrollar fragmentos de Fab humanos contra factor de crecimiento de hepatocitos de ratón y humanos. Estos fragmentos Fab no tuvieron ningún efecto sobre la actividad de HGF cuando se usaron solos. Cuando uno de los fragmentos de Fab HGF anti-humano fue combinado con un anticuerpo que se enlazó al fragmento Fab por sí mismo, mejoró realmente la actividad de HGF en un análisis biológico.

Cao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 98:7443, 2001 demostraron que la administración de un cóctel de tres mAbs anti-HGF, los cuales fueron seleccionados en base a su capacidad para inhibir la actividad de dispersión de HGF in vitro, fueron aptos de inhibir el crecimiento de tumores humanos en el modelo de ratón desnudo de xenoinjerto (figura 3). Postularon que tres mAbs que reconocen tres diferentes sitios de enlace sobre HGF eran requeridos para inhibir las bioactividades de HGF in vivo: dos mAbs inhibieron el enlace de

HGF a cMet y un mAb inhibió el enlace de HGF a heparina. Sin embargo, no es práctico por razones comerciales y regulatorias desarrollar un fármaco que combine tres nuevos mAbs, por ejemplo debido a que alguna actividad clínica de cada anticuerpo necesitaría ser demostrada independientemente.

Así, hay la necesidad de un solo anticuerpo monoclonal que bloquee la actividad biológica de HGF in vitro e in vivo. La presente invención satisface esta y otras necesidades.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En una modalidad, la invención proporciona un mAb neutralizante al factor de crecimiento de hepatocito humano (HGF). El mAb inhibe por lo menos una y preferiblemente varias o todas las actividades biológicas de HGF en las que se incluyen enlace a su receptor cMet, induciendo la dispersión de células tales como células de riñón canino Madin-Darby, inducir la proliferación de células epiteliales de chango 4MBr-5 y/o hepatocitos y/o HUVEC, e inducir angiogénesis. El mAb anti-HGF puede inhibir tal actividad cuando es usado como un solo agente. Un mAb anti-HGF preferido, inhibe de preferencia completamente, el crecimiento de un gen de injerto de tumor humano en un ratón. Preferiblemente, el mAb de la invención es quimérico, humanizado, semejante a humano o humano. Anticuerpos ejemplares son L2G7 y sus formas quiméricas y humanizadas.

También se proporcionan líneas celulares que producen tales anticuerpos. En otra modalidad, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-HGF neutralizante, por ejemplo L2G7 quimérico o humanizado. En una
5 tercera modalidad, la composición farmacéutica es administrada a un paciente para tratar cáncer u otra enfermedad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra modelos esquemáticos de HGF y
10 cMet.

La figura 2 es una gráfica que muestra que NK4 inhibe parcialmente el crecimiento primario de tumor de pulmón murino LLC en ratones desnudos (de Kuba et al., Cancer Res. 60;6737, 2000). NK4 fue sometido a infusión continuamente durante 14
15 días a partir del cuatro día después del implante del tumor s.c. en ratones desnudos.

La figura 3 es una gráfica que muestra que un cóctel de tres mAbs anti-HGF se requiere para inhibir el crecimiento de células U-118 de tumor de cerebro humano en ratones desnudos
20 (de Cao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 98:7443, 2001). Células de tumor U-118 fueron inyectadas s.c. a ratones desnudos. A partir del día 1 mAbs anti-HGF A-1, -5 y -7 o mAbs 7-2 y 3 fueron administrados a 200 µg/inyección, dos veces/semana durante 10 semanas.

25 La figura 4 muestra la determinación de epítomos de

enlace relativos de mAbs L1H4, L2C7, L2G7 utilizando ELISA de enlace competitivo. Las placas fueron recubiertas con HGF recombinante (rHGF), bloqueado con leche descremada e incubadas con concentración subóptima de mAbs biotinilados en presencia
5 de cantidades en exceso 100x de mAbs sin marcar. El mAb biotinilado enlazado fue detectado mediante la adición de HRP-Estreptavidina.

La figura 5 muestra el enlace de mAbs anti-HGFG a rHGF, tal como se determina en un ELISA de enlace de HGF
10 directo. La placa fue recubierta con el sobrenadante de H1-F11 que contiene rHGF, bloqueado con 2% de leche descremada e incubado con mAbs, seguido por la adición de HRP-GαMIgG (como se describe en los ejemplos).

La figura 6 muestra las capacidades de mAbs de anti-
15 HGF para capturar rHGF-Bandera en solución. mAbs anti-HGF fueron capturados en una placa de ELISA recubierta con IgG anti-ratón de cabra. Luego las placas fueron bloqueadas con 2% de leche descremada incubadas con rHGF-Bandera, seguida por anti-Bandera HRP-M2 (como se describe en los ejemplos).

La figura 7 muestra la inhibición del enlace rHGF-Bandera a cMet-Fc mediante mAbs anti-HGF en una ELISA de
20 captura. cMet-Fc capturado sobre placa recubierta con IgG anti-humano de cabra es incubado con HGF-Bandera pre-incubado con/sin mAbs. El rHGF-Bandera enlazado fue detectado mediante
25 la adición de mAb anti-Bandera HRP-M2 (como se describe en los

ejemplos).

La figura 8 muestra la neutralización de la dispersión de MDCK inducida por HGF mediante L2G7 de mAb anti-HGF. (A) Control sin ningún tratamiento. (B) rHGF+IgG. (C) rHGF+mAb L2G7. Células MDCK fueron incubadas con una dilución 1:20 del sobrenadante de cultivo H1-F11 (~ 3 µg/ml de HGF) en presencia de 10 µg/ml de mAbs. Las fotografías fueron tomadas a una amplificación de 100x.

La figura 9 muestra la inhibición de proliferación inducida por HGF de células Mv LU mediante mAb de L2G7. El exceso molar de mAb con respecto a HGF es mostrado en el eje horizontal y el cpm x 10⁻² incorporado es mostrado en el eje vertical. Los puntos de datos fueron obtenidos por triplicado.

La figura 10 muestra la inhibición de proliferación inducida por HGF de HUVEC mediante mAb de L2G7 y anticuerpo de ratón de control (mIgG). Los puntos de datos fueron obtenidos por triplicado.

La figura 11 muestra el efecto sobre la proliferación inducida por HGF de células de tumor de colon HCT 116 mediante anticuerpos L2G7 y L1H4. Los puntos de datos fueron obtenidos por triplicado.

La figura 12 muestra el efecto del tratamiento con mAb L2G7 o PBS (control) sobre el crecimiento de tumores U-118 en grupos de ratones NIH III Beige/desnudos (n=6). Las flechas

indican cuando comienzan las inyecciones. (A) Tamaño de tumor contra el día a partir del implante de tumor. (B) Masa del tumor al final del experimento.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-HGF neutralizantes, composiciones farmacéuticas que los comprenden y métodos de uso de los mismos para el tratamiento de enfermedades.

10

1. Anticuerpos

Los anticuerpos son moléculas complejas muy grandes (peso molecular de ~150,000 o aproximadamente 1320 aminoácidos) con estructura interna intrincada. Una molécula de anticuerpo natural contiene dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, cada par tiene una cadena ligera y una cadena pesada. Cada cadena ligera y cadena pesada a su vez consiste de dos regiones: una región variable ("V") involucrada en el enlace del antígeno objetivo y una región constante ("C") que interactúa con otros componentes del sistema inmune. Las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada se pliegan conjuntamente en el espacio tridimensional para formar una región variable que enlaza el antígeno (por ejemplo, un receptor sobre la superficie de una célula). Dentro de cada región variable de cadena ligera o cadena pesada, hay tres

25

segmentos cortos (en promedio de 10 aminoácidos de longitud) llamadas las regiones que determinan la complementariedad ("CDR"). Los seis CDR en un dominio variable de anticuerpo (tres de la cadena ligera y tres de la cadena pesada) se pliegan conjuntamente en un espacio tridimensional para formar el sitio de enlace de anticuerpo real que se fija sobre el antígeno de anticuerpo. La posición y longitud de las CDR han sido definidas de manera precisa. Kabat, E. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1983, 1987. La parte de una región variable no contenida en las CDR es llamada la estructura, que forma el ambiente para las CDR.

Un anticuerpo monoclonal (mAb) es una sola especie molecular de anticuerpo y por consiguiente no abarca anticuerpos policlonales producidos al inyectar un animal (tal como un roedor, conejo o cabra) con un antígeno y extraer el suero del animal. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo diseñado genéticamente (monoclonal) en el cual las CDR de un anticuerpo de ratón ("anticuerpo donador"), que puede también ser de rata, hámster u otra especie similar) son injertadas sobre un anticuerpo humano ("anticuerpo aceptor"). Los anticuerpos humanizados pueden también ser elaborados con menos que las CDR completas de un anticuerpo de ratón (por ejemplo, Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002). Así, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene CDR de un

anticuerpo donador y estructura de región variable y regiones constantes de un anticuerpo humano. Así, comúnmente un anticuerpo humanizado comprende (i) una cadena ligera que comprende 3 CDR de un anticuerpo de ratón, por ejemplo L2G7, 5 una estructura de región variable de un anticuerpo humano y una región constante humana y (ii) una cadena pesada que comprende tres CDR de un anticuerpo de ratón, por ejemplo L2G7, una estructura de región variable de un anticuerpo humano y una región constante humana. Además, con el fin de retener alta 10 afinidad de enlace, por lo menos uno de dos elementos estructurales adicionales pueden ser usados. Véase patente estadounidense No. 5,530,101 y 5,585,089, cada una de las cuales es incorporada en la presente por referencia, que proporcionan instrucciones detalladas para la construcción de 15 anticuerpos humanizados.

En el primer elemento estructural, la estructura de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado es escogida para tener identidad de secuencia máxima (entre 65% y 95%) con la estructura de la región variable de cadena pesada 20 del anticuerpo donador, al seleccionar apropiadamente el anticuerpo aceptor de entre los muchos anticuerpos humanos conocidos. La identidad de secuencia es determinada cuando las secuencias de anticuerpo que son comparadas son alineadas de acuerdo con la convención de numeración de Kabat. En segundo 25 elemento estructural, al construir el anticuerpo humanizado,

aminoácidos seleccionados en la estructura del anticuerpo
aceptor humano (fuera de las CDR) son reemplazadas con
aminoácidos correspondientes del anticuerpo donador, de acuerdo
con reglas especificadas. Específicamente, los aminoácidos a
5 ser reemplazados en la estructura son escogidos en base a su
capacidad para interactuar con las CDR. Por ejemplo, los
aminoácidos reemplazados pueden estar adyacentes a una CDR en
la secuencia de anticuerpo donador o dentro de 4-6 ángstroms de
una CDR en el anticuerpo humanizado como se mide en el espacio
10 tridimensional.

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el cual
la región variable de un anticuerpo de ratón (u otro roedor) es
combinada con la región constante de un anticuerpo humano; su
construcción por medio de ingeniería genética es bien conocida.
15 Tales anticuerpos retienen la especificidad de enlace del
anticuerpo de ratón, en tanto que son aproximadamente dos
tercios humanos. La proporción de secuencia no humana presente
en anticuerpos de ratón, quiméricos y humanizados sugiere que
la inmunogenicidad de anticuerpos quiméricos es intermedia
20 entre anticuerpos de ratón y humanizados. Otros tipos de
anticuerpos diseñados genéticamente que pueden tener
inmunogenicidad traducida en relación con los anticuerpos de
ratón incluyen anticuerpos humanos elaborados utilizando
métodos de exhibición de fago (Dower et al., WO 91/17271;
25 McCafferty et al., WO 92/001047; Winter, WO 92/20791; y Winter,

FEBS Lett. 23:92, 1998, cada una de las cuales es incorporada en la presente por referencia) o utilizando animales transgénicos (Lonberg et al., WO 93/12227; Kucherlapati WO 91/10741, cada una de las cuales es incorporada en la presente
5 por referencia).

Como se usa en la presente, el término anticuerpo "semejante a humano" se refiere a un Mab en el cual una porción sustancial de la secuencia de aminoácidos de una o ambas cadenas (por ejemplo, aproximadamente 50% o más) ser origina de
10 genes de inmunoglobulina humanos. De aquí, los anticuerpos semejantes a humanos abarcan pero no están limitados a anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos. Como se usa en la presente, un anticuerpo de "inmunogenicidad reducida" es uno que se espera que tenga significativamente menos
15 inmunogenicidad de un anticuerpo de ratón cuando es administrado a pacientes humanos. Tales anticuerpos abarcan anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, también como anticuerpos elaborados al reemplazar aminoácidos específicos en anticuerpos de ratón que pueden contribuir a epítopos de célula
20 B o T, por ejemplo residuos expuestos (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991). Como se usa en la presente, un anticuerpo "diseñado genéticamente" es uno para el cual los genes han sido contruidos o puestos en un ambiente no natural (por ejemplo, genes humanos en un ratón o en un bacteriófago) con la ayuda de
25 técnicas de ADN recombinantes y por consiguiente por ejemplo no

abarcaría un mAb de ratón elaborado con tecnología de hibridoma convencional.

El epítipo de un mAb es la región de su antígeno al cual el mAb se enlaza. Dos anticuerpos se enlazan al mismo o
5 epítipo traslapante si cada uno inhibe competitivamente (bloquea) el enlace del otro al antígeno. Esto es, un exceso 1x, 5x, 10x, 20x ó 100x de un anticuerpo inhibe el enlace del otro por al menos 50%, pero preferiblemente 75%, 90% o aún 99%, tal como se mide en un análisis de enlace competitivo en
10 comparación con un control que carece del anticuerpo competente (véase, por ejemplo Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990, que es incorporado en la presente por referencia). Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el
15 antígeno que reducen o eliminan el enlace de un anticuerpo reducen o eliminan el enlace de otro. Dos anticuerpos tienen epítipos traslapantes si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan el enlace de un anticuerpo reducen o eliminan el enlace del otro.

20

2. Anticuerpos anti-HGF Neutralizantes

Un anticuerpo monoclonal (mAb) que enlaza HGF (esto es, un mAb anti-HGF) se dice que neutraliza HGF o es neutralizante, si el enlace inhibe parcial o completamente una
25 o más actividades biológicas de HGF (esto es, cuando el mAb es

usado como un solo agente). De entre las propiedades biológicas de HGF que un anticuerpo neutralizante puede inhibir están la capacidad del HGF para enlazarse a su receptor cMet, provocar la dispersión de ciertas líneas celulares tales como células de riñón canino Madin-Darby (MDCK); estimular la proliferación (esto es, ser mitogénicas para) ciertas células en las que se incluyen hepatocitos, células epiteliales de chango 4MBr-5 y varias células de tumor humano o estimular la angiogénesis, por ejemplo tal como se mide mediante estimulación de proliferación de célula endotelial vascular humana (HUVEC) o formación de tubo o mediante inducción de vasos sanguíneos cuando es aplicado a la membrana corialantoica embriónica de pollo (CAM). Los anticuerpos de la invención se enlazan preferiblemente a HGF humano (esto es, a la proteína codificada por la secuencia de GenBank con el número de Acceso D90334 (incorporado por referencia)).

Un mAb neutralizante de la invención a una concentración de por ejemplo 0.01, 0.1, 0.5, 1.2, 5, 10, 20, ó 50 µg/ml inhibirá una función biológica de HGF (por ejemplo, estimulación de proliferación o dispersión) por aproximadamente por lo menos 50%, pero preferiblemente 75%, más preferiblemente por 90% ó 95% o aún 99% y más de preferencia aproximadamente 100% (esencialmente por completo) tal como se analiza mediante los métodos descritos en los ejemplos o conocidos en el arte. La inhibición es considerada completa si

el nivel de actividad está dentro del margen de error para un control negativo que carece de HGF. Comúnmente, la extensión de inhibición es medida cuando la cantidad de HGF usada es justo suficiente para simular plenamente la actividad biológica o es

5 0.05, 0.1, 0.5, 1, 3, ó 10 µg/ml. Preferiblemente, por lo menos 50%, 75%, 90% ó 95% o la inhibición esencialmente completa será obtenida cuando la proporción molar de anticuerpo a HGF es 0.5x, 1x, 2x, 3x, 5x ó 10x. Preferiblemente, el mAb será neutralizante, esto es, inhibe la actividad biológica, cuando

10 es usado como un solo agente, pero posiblemente 2 mAbs serán necesarios conjuntamente para dar la inhibición. Más preferiblemente, el mAb neutralizará no solo uno sino varias de las actividades biológicas enlistadas anteriormente; por propósitos de la presente, un mAb anti-HGF que es usado como un

15 solo agente neutraliza todas las actividades biológicas de HGF será llamado "plenamente neutralizante" y tal mAb son más preferibles. Los mAbs de la invención serán preferiblemente específicos para HGF, esto es no se enlazarán o solamente se enlazarán a una extensión mucho menor (por ejemplo Ka por lo

20 menos diez veces menos), proteínas que están relacionadas a HGF tales como factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los anticuerpos preferidos carecen de actividad agonista hacia HGF. Esto es, los anticuerpos bloquean la interacción de HGF con cMet sin

25 estimular células que forman HGF directamente. Los mAbs de la

invención tienen comúnmente una afinidad de enlace (K_0) por HGF de por lo menos 10^7 M^{-1} , pero preferiblemente 10^8 M^{-1} o más alto, y más preferiblemente 10^9 M^{-1} o más alto o aún 10^{10} M^{-1} o más alto.

5 Los mAbs de la invención incluyen anticuerpos anti-HGF en su forma tetramérica natural (dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas) y pueden ser de cualquiera de los isotipos conocidos IgG, IgA, IgM, IgD e IgE y sus subtipos, por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humanos y IgG1, IgG2, IgG2b y IgG3 de
10 ratón. Los mAbs de la invención también se proponen incluir fragmentos de anticuerpos tales como Fv, Fab y $F(ab')_2$; anticuerpos híbridos bifuncionales (por ejemplo, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987), anticuerpos de una sola cadena (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85:5879,
15 1988; Bird et al., Science 242:423, 1988); y anticuerpos con regiones constantes alteradas (por ejemplo, patente estadounidense No. 5,624,821). Los mAbs pueden ser de origen animal (por ejemplo, ratón, rata, hámster o pollo), o pueden ser diseñados genéticamente. Los mAbs de roedor son fabricados
20 mediante métodos estándar bien conocidos en el arte, que comprenden inmunización múltiple con HGF en adyuvante apropiado i.p., i.v., o a la pata, seguido por extracción de células del bazo o células del nodo linfático y fusión con una línea celular inmortalizada apropiada y luego selección de hibridomas
25 que producen enlace de anticuerpo a HGF, por ejemplo véase

Ejemplos. Los mAbs quiméricos y humanizados, elaborados por los métodos conocidos en la técnica mencionados supra, son modalidades preferidas de la invención. Los anticuerpos humanos elaborados por ejemplo mediante métodos de exhibición de fago o 5 métodos de ratones transgénicos son también preferidos (véase, por ejemplo, Dower et al., McCafferty et al., Winter, Lonberg et al., Kucherlapati, supra). Más en general, anticuerpos de inmunogenicidad reducida y diseñados genéticamente semejantes a humanos como se definen en la presente son todos preferidos.

10 Los mAbs anti-HGF neutralizantes mAbs L1H4, L2C7 y L2G7 descritos infra son ejemplos de la invención, L2G7 es un ejemplo preferido. Los mAbs neutralizantes con el mismo o un epítipo traslapante como cualquiera de estos mAbs, por ejemplo L2G7, proporcionan otros ejemplos. Una forma quimérica o 15 humanizada de L2G7 o con LGF es una modalidad especialmente preferida. Un mAb (en los que se incluyen anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos) que compite con L2G7 por el enlace a HGF y neutraliza HGF en por lo menos uno y preferiblemente todos los análisis in vitro o in vivo descritos 20 en la presente es también preferido. Los mAbs que son 90%, 95%, 99% ó 100% idénticos (determinado al alinear secuencias de anticuerpo de acuerdo con la convención de Kabat) a L2G7 en secuencia de aminoácidos, por lo menos en las CDR están incluidos en la invención. Preferiblemente, tales anticuerpos 25 difieren de L2G7 por un número pequeño de sustituciones de

aminoácido funcionalmente inconsecuencial (por ejemplo, sustituciones conservadoras), cancelaciones o inserciones. Preferiblemente, tales anticuerpos retienen las propiedades funcionales de L2G7, esto es, tales anticuerpos neutralizan HGF en por lo menos uno y preferiblemente todos los análisis in vitro o in vivo descritos en la presente. Por propósitos de clasificar sustituciones de aminoácidos como conservadoras o no conservadoras, los aminoácidos pueden ser agrupados como sigue: Grupo I (cadenas laterales hidrofóbicas): norleucina, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrofílicas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen la orientación de cadena); gly, pro; Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservadoras involucran sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Las sustituciones no conservadoras constituyen intercambiar un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

Los mAbs naturales de la invención pueden ser producidos a partir de sus hibridomas. Los mAbs diseñados genéticamente, por ejemplo mAbs quiméricos o humanizados, pueden ser expresados mediante una variedad de métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, genes que codifican sus regiones V de cadena ligera y pesada pueden ser sintetizados a partir de oligonucleótidos traslapantes e insertados

conjuntamente con regiones C disponibles a vectores de expresión (por ejemplo, disponibles comercialmente de Invitrogen) que proporcionan las regiones reguladoras necesarias, por ejemplo promotores, mejoradores, sitios poli A, etc. El uso del promotor-mejorador de CMV es preferido. Luego los vectores de expresión pueden ser transfectados utilizando varios métodos bien conocidos tales como lipofección o electroporación a una variedad de líneas celulares mamíferas tales como CHO o mielomas no productoras que incluyen Sp2/0 y NS0, y células que expresan los anticuerpos seleccionados mediante selección de anticuerpo apropiada. Véase, por ejemplo patente estadounidense No. 5,530,101. Cantidades más grandes de anticuerpo pueden ser producidas mediante cultivo de las células en bioreactores disponibles comercialmente.

Una vez expresados, los mAbs u otros anticuerpos de la invención pueden ser purificados de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica tales como microfiltración, ultrafiltración, proteína A o cromatografía de afinidad G, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico y/u otras formas de cromatografía de afinidad en base a tintes orgánicos o los semejantes. Anticuerpos sustancialmente puros de aproximadamente 90 ó 95% de homogeneidad son preferidos y 98% ó 99% o más homogeneidad son preferidos, para usos farmacéuticos.

3. Métodos Terapéuticos

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende los anticuerpos descritos en la presente. Esto es, los anticuerpos pueden ser usados en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de enfermedades. Formulaciones farmacéuticas (esto es, medicamentos) de los anticuerpos contienen el mAb en un portador aceptable fisiológicamente, opcionalmente con excipientes o estabilizadores, en forma de soluciones liofilizadas o soluciones acuosas. Portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos a los receptores a las dosificaciones y concentraciones usadas e incluyen soluciones reguladoras del pH tales como fosfato, citrato, o acetato a un pH comúnmente de 5.0 a 8.0, más frecuentemente 6.0 a 7.0; sales tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, etc. para fabricar isotónicos; antioxidantes, conservadoras, polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas, polímeros hidrofóbicos tales como polysorbate 80, aminoácidos, carbohidratos, agentes quelantes, azúcares y otros ingredientes estándares conocidos para aquellos experimentados en el arte (Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. 1980). El mAb está comúnmente presente a una concentración de 1-100 mg/ml, por ejemplo 10 mg/ml.

Los anticuerpos de la invención están comúnmente

sustancialmente puros de contaminante indeseable. Esto significa que el anticuerpo es comúnmente por lo menos aproximadamente 50% en peso/peso (peso/peso) puro, también como sustancialmente libre de proteínas y contaminantes
5 interferentes. Preferiblemente, los anticuerpos son por lo menos 90%, 95% ó 99% puros peso/peso. Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son usualmente estériles, sustancialmente isotónicas y preparadas de acuerdo con las prácticas de buena manufactura de la FDA o cuerpo
10 similar.

En otra modalidad preferida, la invención proporciona un método de tratamiento de un paciente con una enfermedad utilizando un mAb anti-HGF en una formulación farmacéutica. El mAb preparado en una formulación farmacéutica puede ser
15 administrado a un paciente mediante cualquier ruta apropiada, especialmente parenteral mediante infusión intravenosa o inyección de bolo, intramuscular o subcutáneamente. La infusión intravenosa puede ser dada en tanto como 15 minutos, pero más frecuentemente durante 30 minutos o más, 1, 2 o aún 3 horas. El
20 mAb puede también ser inyectado directamente al sitio de la enfermedad (por ejemplo un tumor) o encapsulado en agentes portadores tales como liposomas. La dosis dada será suficiente para aliviar la condición que es tratada ("dosis terapéuticamente efectiva") y es probable que sea de 0.1 a 5
25 mg/kg de peso corporal, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 mg/kg, pero

puede ser tan alta como 10 mg/kg o aún 15 ó 20 mg/kg. Una dosis unitaria fija puede también ser dada, por ejemplo 50, 100, 200, 500 ó 1000 mg o la dosis puede estar basada en el área superficial del paciente, por ejemplo 100 mg/m². Usualmente entre 1 y 8 dosis (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) son administradas para tratar cáncer, pero 10, 20 o más dosis pueden ser administradas. El mAb puede ser administrado diariamente, bi-semanalmente, semanalmente, una semana si y otra semana no, mensualmente u en algún otro intervalo, dependiendo por ejemplo de la vida media del mAb, por 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas, 3-6 meses o más tiempo. Cursos repetidos de tratamiento son también posibles como lo es la administración crónica. Un régimen de una dosis e intervalos de administración que alivian o por lo menos que tiene parcialmente los síntomas de la enfermedad (bioquímica, histológica y/o clínica), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en desarrollo de la enfermedad es denominado como un régimen terapéuticamente efectivo.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden también ser usadas en profilaxis de un paciente en riesgo de cáncer. Tales pacientes incluyen aquellos que tienen susceptibilidad genética al cáncer, pacientes que han sufrido exposición a agentes carcinógenos, tales como radiación o toxinas y pacientes que han sufrido tratamiento previo para el

cáncer y están en riesgo de recurrencia. Una dosis profiláctica es una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la severidad o retardar el inicio de la enfermedad, en los que se incluyen síntomas bioquímicos, histológicos y/o clínicos de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. La administración de una composición farmacéutica por una cantidad y a intervalos efectivos para efectuar uno o más de estos objetos es denominado como un régimen profilácticamente efectivo.

Las enfermedades especialmente susceptibles a terapia con los mAbs anti-HGF de esta invención incluyen tumores sólidos conocidos o que se sospecha que requieren angiogénesis o que están asociados con niveles elevados de HGF, por ejemplo cáncer de ovarios, cáncer de pecho, cáncer de pulmón (de célula pequeña o de célula no pequeña), cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer gástrico, cáncer de hígado, tumores de cabeza y cuello, melanoma, sarcomas y tumores de cerebro (por ejemplo glioblastomas), de niños o adultos. El tratamiento puede también ser administrado a pacientes que tienen leucemias o linfomas. En una modalidad preferida, el mAb anti-HGF puede ser administrado junto con (esto es, antes, durante o después) otra terapia anti-cáncer. Por ejemplo, el mAb anti-HGF puede ser administrado junto con cualquiera de uno o más de los fármacos quimioterapéuticos

conocidos para aquellos de habilidad en el arte de oncología, por ejemplo taxol (paclitaxel) o sus derivados, compuestos de platino tales como carboplatina o cisplatina, antroclinas tales como doxorubicina, agentes alquilantes tales como 5 ciclofosfamida, anti-metabolitos tales como 5-fluorouracilo o etopósido. El mAb anti-HGF puede ser administrado en combinación con dos, tres o más de estos agentes en un régimen quimioterapéutico estándar, por ejemplo taxol y carboplatina, por ejemplo para cáncer de pecho y cáncer de ovario. Otros 10 agentes con los cuales el mAb anti-HGF puede ser administrado incluyen compuestos biológicos tales como anticuerpos monoclonales, en los que se incluyen Herceptin™ contra el antígeno HER2, Avatin™ contra VEGF o anticuerpos al receptor EGF, también como fármacos anti-angiogénicos de molécula 15 pequeña o fármacos antagonistas del receptor EGF. Además, el mAb anti-HGF puede ser usado junto con terapia de radiación o cirugía.

El tratamiento (por ejemplo quimioterapia estándar) que incluye el anticuerpo mAb anti-HGF puede incrementar la 20 sobrevivencia libre de avance promedio o tiempo de sobrevivencia global de pacientes con estos tumores (por ejemplo, de ovario, pecho, pulmón, páncreas, cerebro y colon, especialmente cuando es recaída o refractario) por al menos 30% ó 40%, pero preferiblemente 50%, 60% a 70% o aún 100% o más 25 largo, en comparación con el mismo tratamiento (por ejemplo,

quimioterapia) pero sin mAb anti-HGF. Además o
alternativamente, el tratamiento (por ejemplo quimioterapia
estándar) que incluye el mAb anti-HGF puede incrementar la
velocidad de respuesta completa, velocidad de respuesta parcial
5 o velocidad de respuesta objetivo (completa + parcial) de
pacientes con estos tumores (por ejemplo de ovario, pecho,
pulmón, páncreas, cerebro y colon, especialmente cuando es de
recaída o refractaria) por al menos 30% o 40% pero
preferiblemente 50%, 60% a 70% o aún 100% en comparación con el
10 mismo tratamiento (por ejemplo quimioterapia) pero sin el mAb
anti-HGF. Opcionalmente, el tratamiento puede inhibir la
invasión de tumor o metástasis.

Comúnmente, en un estudio clínico (por ejemplo, un
estudio de fase Ii, fase II/III o fase III), los incrementos
15 mencionados anteriormente en supervivencia libre de avance
promedio y/o velocidad de respuesta de los pacientes tratados
con quimioterapia más el mAb anti-HGF, en relación con el grupo
de control de pacientes que reciben quimioterapia sola (o más
placebo), será estadísticamente significativa, por ejemplo a 0
20 = 0.05 ó 0.01 ó aún nivel de 0.001. También se comprenderá por
aquel de habilidad en el arte que la velocidad de respuesta
completa y parcial son determinadas mediante criterios
objetivos usados comúnmente en estudios clínicos para cáncer,
por ejemplo como se enlista o aceptados por el Instituto
25 Nacional de Cáncer y/o Administración de Alimentos y Fármacos.

4. Otros Métodos

Los mAbs anti-HGF de la invención también encuentran uso en métodos de diagnóstico, prognósticos y de laboratorio.

5 Pueden ser usados para medir el nivel de HGF en un tumor o en la circulación de un paciente con un tumor y por consiguiente para seguir y guiar el tratamiento del tumor. Por ejemplo, un tumor asociado con altos niveles de HGF sería especialmente susceptible a tratamiento con un mAb anti-HGF. En modalidades

10 particulares, los mAbs pueden ser usados en un ELISA o prueba inmunológica para medir el nivel de HGF, por ejemplo en una muestra de biopsia de tumor o en un suero o en un sobrenadante de medios de células que segregan HGF en el cultivo celular. El uso de dos mAbs anti-HGF que se enlazan a diferentes epítopos

15 (esto es, que no compiten por el enlace) serán especialmente útiles para desarrollar una ELISA de "emparedado" sensible para detectar HGF. Para varios análisis, el mAb puede ser marcado con moléculas fluorescentes, moléculas marcadas por centrifugación, enzimas o radioisótopos y pueden ser provistos

20 en forma de equipo con todos los reactivos necesarios para efectuar el análisis en cuanto a HGF. En otros usos, los mAbs anti-HGF serán usados para purificar HGF, por ejemplo mediante cromatografía de afinidad.

5

1. Generación de mAbs anti-HGF

Para generar mAbs los cuales se enlazan a y bloquean las actividades de HGF humano, HGF humano recombinante (rHGF) fue producido primero en un sistema de expresión de mamífero.

5 Los cADN que codifican el HGF recombinante (rHGF) o péptido rHGF-Bandera (residuos de 8 aminoácidos de bandera anexado al término c de HGF) fueron contruidos en un vector de expresión inducible pIND (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 93:3346, 1996). Luego estos cADN fueron transfectados a células de

10 fibroblasto de riñón humano EcR-293 (Invitrogen) utilizando el reactivo de transfección Eugene (Roche). Líneas celulares estables, H1-F11 y 24.1, que segregan HGF y HGF-Bandera respectivamente, fueron seleccionados en presencia de 600 µg/ml de G418 de 400 µg/ml de Zeocin (Invitrogen). H1-F11 y 24.1

15 fueron inducidos para segregar HGF y HGF-Bandera mediante tratamiento con 4 µM de Ponasterona A (Invitrogen) durante 4-5 días en DMEM libre de suero que contiene glutamina y antibióticos. Después que los segregados fueron separados mediante centrifugación a 15,000 rpm durante 30 minutos a 4°C,

20 el HGF segregado al sobrenadante del cultivo fue concentrado a aproximadamente 100 veces utilizando un cartucho de ultrafiltración de membrana con un filtro de corte de peso molecular 50,000 [filtro YM-50 amicon Centriprep seguido por filtro microcon YM-50 (Millipore)]. Tal sobrenadante de cultivo

25 H1F11 concentrado contiene ~100 µg/ml de HGF y ~120 µg/ml de

albúmina de suero bovino.

Ratones Balb/c fueron inmunizados en cada pata trasera >10 veces a intervalos de una semana, con 1-2 µg de rHGF purificado (Pepro Tech) o 1-2 µg de rHGF más 1-2 µg de BSA (sobrenadante de cultivo H1-F11 concentrado) resuspendido en MPL-TDM (Ribi Immunochem. Research). Tres días después del refuerzo inicial, ces de nodo linfático popliteal fueron fusionadas con células de mieloma murino, P3X63AgU.1 (ATCC CRL1597), utilizando 35% de polietilenglicol. Los hibridomas fueron seleccionados en media HAT como se describe (Chuntharapai y Kim, J. Immunol. 163:766, 1997, que es incorporado en la presente por referencia). Diez días después de la fusión, los sobrenadantes de cultivo de hibridoma fueron seleccionados en un ELISA de enlace de HGF directo también como en un ELISA de captura de HGF-Bandera. El último análisis fue usado para confirmar adicionalmente la especificidad de los mAbs anti-HGF seleccionados utilizando el ELISA de enlace de HGF directo y para seleccionar mAbs que se pueden enlazar a HGF en fase de solución. El bloqueo de las actividades de mAbs seleccionados fue luego determinada en el ELISA de enlace de cMet-Fc HGF-Bandera y en el análisis de dispersión de MDCK como se describe (Jeffers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 95:14417, 1998). Hibridomas seleccionados fueron clonados dos veces utilizando técnicas de dilución limitante. El isotipo de mAbs fue determinado utilizando un equipo de isotipificación

(Zymed). Los ascites de mAbs seleccionados fueron criados y purificados utilizando el equipo de purificación ImmunoPure (A/G) IgG (Pierce). También mAbs biotinilados fueron preparados utilizando EZ-sulfo-NHS-LC-Biotin de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por Pierce. Cada uno de los análisis a los que se hace referencia en la presente es descrito en más detalle a continuación. Para el ELISA de enlace de HF directo, placas de microtítulo (Maxisorb; Nunc) son recubiertas con 50 µl/cavidad de sobrenadantes de cultivo H1-F11 que contienen rHGF, diluido en PBS a una proporción 1:2 de HGF/PBS, en toda la noche a 4°C. Después del lavado de la placa, los sitios de enlace no específicos son bloqueados con PBS que contiene 2% de leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Después del lavado de la placa, 50 µl/cavidad de mAbs purificado o sobrenadantes de cultivo de hibridoma son agregados a cada cavidad durante 1 hora. Después del lavado, las placas son luego incubadas con 50 µl/cavidad de 1 µg/ml de IgG anti-ratón HRP-cabra (HRP-GαMIgG, Cappel) durante 1 hora. El HRP-GαMIgG enlazado es detectado mediante la adición del sustrato de tetrametilbenzidina (Sigma). La reacción es detenida mediante la adición de 1N H₂SO₄ y luego las placas son leídas a 450 nm utilizando un lector de placas de ELISA. Los lavados son efectuados 3 veces en solución reguladora del pH de lavado (PBS que contiene 0.05% de Tween 20).

Para el análisis de ELISA de captura de HGF-Bandera, las placas de microtítulo son recubiertas con 50 µl/cavidad de 2 µg/ml de anticuerpo de cabra específicos a la porción Fc de IgG de ratón (GαMIgG-Fc) en PBS durante toda la noche a 4°C y
5 bloqueados con 2% de leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavado, las placas son incubadas con 50 µl/cavidad de mAbs purificado o sobrenadantes de cultivo de hibridoma durante 1 hora. Después del lavado, las placas son luego incubadas con 50 µl/cavidad de 24.1 células de
10 sobrenadante de cultivo que contiene rHGF-Bandera. Después del lavado, las placas son luego incubadas con 50 µl/cavidad de mAbs anti-Bandera HRP-M2 (Invitrogen) en presencia de 15 µg/ml de IgG murino. El HRP-anti-Bandera M2 enlazado es detectado mediante la adición del sustrato como se describe
15 anteriormente. Los lavados son efectuados 3 veces en solución reguladora del pH de lavado.

Por lo menos tres mAbs, designados L1H4, L2C7 y L2G7, obtenidos de hibridomas generados al inmunizar los ratones Balb/c con rHGF en sobrenadante de cultivo H1-F11 concentrado
20 como se describe anteriormente, mostraron enlace tanto en el análisis de ELISA de enlace rHGF directo y ELISA de captura de HGF-Bandera y fueron seleccionados para estudio adicional. Luego estos hibridomas fueron clonados dos veces, los aceptables fueron criados en ratón mediante métodos estándar y
25 los mAbs fueron purificados utilizando una columna de proteína

G/A. Sus isotipos fueron determinados utilizando un equipo de isotipificación (Zymed Lab). El hibridoma L2G7 ha sido depositado el 29 de abril de 2003 con el American Type Culture Collection, P.O. Box 1549 Manassas, VA 20108, como número ATCC
5 PTA-5162 bajo el tratado de Budapest. Este depósito será mantenido en un depósito autorizado y reemplazado en el caso de mutación no viabilidad o destrucción por un período de por lo menos 5 años después de la petición más reciente de liberación de una muestra fue recibida por el depósito, por un período de
10 por lo menos 30 años después de la fecha de depósito o durante la vida en que se puede hacer cumplir de la patente relacionada, cualquier período que sea más largo. Todas las restricciones en cuanto a la disponibilidad al público de estas líneas celulares será retirada irrevocablemente en la
15 expedición de una patente de la solicitud.

Una vez que un solo mAb anti-humano-HGF arquetipo, por ejemplo L2G7, ha sido aislado que tiene las propiedades deseadas descritas en la presente o HGF neutralizante in vitro y/o que inhibe (por ejemplo completamente) el crecimiento de
20 tumor in vivo, es directo generar otros mAbs con propiedades similares, al utilizar métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, los ratones pueden ser inmunizados con HGF como se describe anteriormente, los hibridomas producidos y los mAbs resultantes seleccionados en cuanto a capacidad para competir
25 con el mAb arquetipo para el enlace a HGF. Alternativamente, el

método de Jespers et al., Biotechnology 12:899, 1994, que es incorporado en la presente por referencia, puede ser usado para guiar la selección mAbs que tienen el mismo epítipo y por consiguiente propiedades similares al arquetipo mAb, por ejemplo L2G7. Utilizando exhibición de fago, primero la cadena pesada del anticuerpo arquetipo es apareada con un repertorio de cadenas ligeras (preferiblemente humanas) para seleccionar un mAb de enlace de HGF, y luego la nueva cadena ligera es apareada con un repertorio de cadenas pesadas (preferiblemente humana) para seleccionar un mAb de enlace de HGF (preferiblemente humano) que tiene el mismo epítipo como el mAb arquetipo.

2. Caracterización de mAbs anti-HGF In Vitro

Los epítopos de enlace de los anticuerpos fueron caracterizados parcialmente mediante un ELISA de enlace competitivo en el cual un exceso 100x de mAb sin marcar fue usado para competir con el enlace del mismo u otro mAb biotinilado en el ELISA de enlace de HGF. La figura 4 muestra que el enlace de los mAbs anti-HGF, L1H4 y L2G7, fue inhibido solamente por si mismos, sugiriendo que reconocen epítopos únicos. El enlace de L2C7 fue inhibido mediante L2G7 pero no por L1H4. Esto sugiere que el epítipo L2C7 pero no por L1H4. Esto sugiere que el epítipo L2C7 se superpone con aquel de L2G7 pero no de L1H4. Sin embargo, L2C7 no fue apto de inhibir el

enlace de L2G7, sugiriendo que los epítomos de L2C7 y L2G7 se superponen pero son distintos y/o la afinidad de L2C7 es mucho más baja que aquella de L2G7. Los epítomos de L1H4, L2C7 y L2G7 son designados respectivamente A, B y C.

5 Las capacidades de enlace relativas de los tres mAbs anti-HGF fueron medida utilizando anticuerpos purificados en el ELISA de enlace de HGF directo, en el cual rHGF es enlazado primero a la placa. En este análisis, L2C7 y L2G7 se enlazan mejor que L1H4 (figura 5). La capacidad de los mAbs a enlazar
10 rHGF-Bandera en solución fue también determinada, utilizando el ELISA de captura de HGF-Bandera. Todos los tres mAbs fueron aptos de capturar rHGF-Bandera en fase de solución pero el mAb L2G7 fue más efectivo que los otros (figura 6). Estos resultados sugieren que el mAb L2G7 tiene la afinidad de enlace
15 más alta a HGF entre los tres mAbs.

Una de las actividades biológicas del HGF es la capacidad de enlazar a su receptor cMet, de tal manera que la capacidad de los mAbs anti-HGF para inhibir el enlace de HGF a cMet fue analizada. Para este análisis, cMet-Fc fue producido
20 primero al transfectar células 293 de fibroblasto humano con residuos que codifican cADN 1-929 ECD de cmet enlazado con la porción Fc de IgG1 de humano (residuos 216 a 446) como se describe por Mark et al., J. Biol. Chem. 267:26166, 1992 en el vector de expresión de exhibición p (Invitrogen). Las placas de
25 microtítulo fueron recubiertas con 50 µl/cavidad de 2 µg/ml de

anticuerpos de cabra específicos a la porción de Fc de IgG humano (GαHIgG-Fc) en PBS durante toda la noche a 4°C y bloqueados con 2% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado de las placas, 50 µl de sobrenadante de cultivo de 293 transfectado con cMet-Fc cADN es agregado a cada cavidad durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado de las placas, 50 µl/cavidad de 24.1 sobrenadante de cultivo celular que contiene rHGF-Bandera, pre-incubado con varias concentraciones de mAbs, es agregado a cada cavidad durante 1 hora. Después del lavado, las placas son luego incubadas con 50 µl/cavidad de mAb anti-Bandera HRP-M2 (Invitrogen). El HRP-anti-Bandera M2 enlazado es detectado por la adición célula sustrato como se describe anteriormente. Los lavados se llevan a cabo 3 veces en solución reguladora del pH de lavado.

En este análisis de inhibición de enlace de HGF-Bandera/cMet-Fc, todos los tres mAbs demostraron algunos grados de inhibición en tanto que un anticuerpo de control Ig no (figura 7). mAb L2G7 a ≥ 1 µg/ml y mAb L1H4 a 50 µg/ml abolieron completamente el enlace de rHGF-Bandera a cMet-Fc; mAb L2C7 aún a 50 µg/ml da solamente 85% de inhibición. De aquí, el mAb L2G7 fue mucho más potente para inhibir la interacción de rHGF-Bandera con cMet-Fc (y por consiguiente supuestamente HGF con su receptor cMet) que los otros anticuerpos, consistente con su afinidad supuestamente mayor

por HGF.

Puesto que la proteína receptora usada en el ELISA de enlace de cMet-Fc/HGF-Bandera es una proteína de receptor soluble, su conformación puede ser diferente de aquella del receptor enlazado de membrana natural. Además, el HGF se enlaza a HSPG además de cMet y es conocido que la interacción HSPG-HGF mejora varias actividades de HGF. Así, los mAbs que bloquean la interacción de HGF con cMet soluble puede no necesariamente tener la capacidad para neutralizar las bioactividades HGF sobre las células. Así, es importante confirmar adicionalmente las actividades de bloqueo de mAb en sistemas biológicos seleccionados. El HGF es conocido como un factor de dispersión potente. Así, la actividad neutralizadora de los mAbs anti-HGF fue también determinada utilizando el análisis de dispersión de riñón canino Madin-Darby (células MDCK obtenidas de ATCC) como se describe (Jeffers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 95:14417, 1998). Células MDCK cultivadas en DMEM complementadas con 5% de FCS son depositadas a 10^3 células/100 μ l/cavidad en presencia de concentraciones predeterminadas de rHGF con o sin mAbs en DMEM con 5% de FCS. Después de 2 días de incubación a 37°C en 5% de CO₂, las células son luego lavadas en PBS, fijas en 2% de formaldehído durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavado en PBS, las células son teñidas con 0.5% de violeta cristal en 50% de etanol (volumen/volumen) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La actividad de

dispersión es determinada mediante examen microscópico.

El sobrenadante de cultivo del HGF que segrega clon H1-F11 descrito anteriormente, fue usado como la fuente de HGF en el análisis de dispersión. Una dispersión tan pequeña como 5 de 1:80 del sobrenadante de cultivo H1-F11 indujo la dispersión y crecimiento de células MDCK. Sin embargo, los análisis de dispersión se llevaron a cabo utilizando una dilución 1:20 de sobrenadante de cultivo H1-F11 (~3 µg/ml). MAb L2G7 aún a una proporción molar de 1:5 de HGF/mAb inhibió la dispersión 10 inducida por HGF de MDCK por sí mismo (figura 8), demostrando conclusivamente que mAb L2G7 es ciertamente un mAb neutralizante. MAb L1H4 a ≥ 20 µg/ml podría también neutralizar la dispersión de MDCK inducida por HGF, en tanto que mAb L2C7 aún a 20 µg/ml dio solo una actividad neutralizante parcial 15 (datos no mostrados).

Las varias características de los tres anticuerpos anti-HGF determinadas en los análisis anteriores son resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización de mAbs a HGF

20	mAb	Isotipo	Epítipo de enlace	Bloqueo de enlace HGF/cMet-Fc	Bloqueo de dispersión de MDCK
	L1H4	G1, κ	A	Bloqueo débil	+
	L2C7	G2b, κ	B	Bloqueo parcial	+/-
	L2G7	G2a, κ	C	Bloqueo fuerte	+++

25 El HGF es un miembro de la familia de factor de

54

crecimiento de enlace de heparina que incluye el factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). También, el HGF tiene ~40% de similitud de secuencia global con el plasminógeno (Nakamura et al., Nature. 342:440; 1989) y comparte una estructura de dominio similar con la proteína que estimula el macrófago (MSF, Wang et al., Scand. J. Immunol. 56:545, 2002). Así, la especificidad de enlace de los anticuerpos anti-HGF debe ser determinada. El enlace de mAbs anti-HGF a estas proteínas relacionadas con HGF (disponibles de R&D Systems) analizado utilizando una ELISA de enlace directo similar a aquel para HGF descrito anteriormente. El mAb L2G7, mAb L2C7 y mAb L1H4 no se enlazarán significativamente a estas proteínas, demostrando su especificidad por HGF.

15

3. Capacidad de los mAbs anti-HGF para Inhibir Actividades

Biológicas que Promueven Tumor de HGF

El HGF tiene una diversidad de actividades biológicas que lo hacen probable que desempeñe una función en el crecimiento e invasividad de ciertos tumores humanos. Una de tales actividades del HGF es como un mitógeno poderoso para hepatocitos y otras células epiteliales (Rubin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 88:415, 1991). Así, para probar adicionalmente la actividad neutralizante de los mAbs anti-HGF, se determina los efectos de los mAbs sobre la proliferación

25

inducida por HGF de células epiteliales de chango 4MBr-5 (ATCC) o hepatocitos de rata. Los hepatocitos son aislados de acuerdo con un método descrito por Garrison y Haynes, J. Biol. Chem. 269:4264, 1985. Las células son resuspendidas a 5×10^4 células/ml en DMEM que contiene 5% de FCS y estimuladas con una concentración predeterminada de HGF con varias concentraciones de mAbs. Después de 2 1/2 días de incubación a 37°C en 5% de CO₂, el nivel de proliferación celular se determina por la adición de ³H-timidina durante 4 horas. Las células son cosechadas utilizando un cosechador de células automatizado y el nivel de ³H-timidina incorporada es determinada en un contador centelleo. A concentración suficiente, el mAb L2G7 puede inhibir extensa o completamente la proliferación inducida por HGF de las células y los mAbs L2C7 y L1H4 inhiben por lo menos parcialmente la proliferación. Estos anticuerpos pueden también inhibir la proliferación inducida por HGF de otras líneas celulares epiteliales.

Por ejemplo, la actividad inhibidora de L2G7 sobre la proliferación inducida por HGF de células Mv 1 Lu de pulmón de mink fue determinada (Borset et al., J. Immunol. Methods 189:59, 1996). Las células cultivadas en DMEM que contiene 10% de FCS son cosechadas mediante el tratamiento con EDTA/tirisina. Después del lavado, las células son resuspendidas a 5×10^4 células/ml en DMEM libre de suero con una concentración predeterminada (50 ng/ml) de HGF +/- varias

concentraciones de mAb. Después de un día de incubación a 37°C en 5% de CO₂, se determina el nivel de proliferación celular mediante la adición de 1 µCi de ³H-timidina por 24 horas adicionales. Las células son cosechadas sobre filtros de fibra de vidrio utilizando un cosechador de células automatizado y se determina el nivel de ³H-timidina incorporada sobre un contador de centelleo. La figura 9 muestra que la adición de una concentración molar 100 veces más alta de mAb L2G7 inhibe completamente la respuesta proliferante de células Mv 1 Lu. Por supuesto, L2G7 aún a una proporción molar triplicada de mAb a HGF mostró inhibición completa, en tanto que el IgG de control no mostró inhibición aún a un exceso molar de 100 veces.

Se reporta también que el HGF es un factor de angiogénesis potente (Bussolino et al., J. Cell Biol. 119:629, 1992; Cherrington et al., Adv. Cancer Res. 79:1, 2000), y la angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, se cree que es esencial para el crecimiento de tumores. Por consiguiente, la capacidad de los mAbs anti-HGF para inhibir las propiedades angiogénicas de HGF es demostrada en tres análisis: (i) proliferación de células endoteliales vasculares humanas (HUVEC), (ii) formación de tubo de HUVEC, y (iii) desarrollo de nuevos vasos sanguíneos sobre la membrana corioalantoica de embrión de pollo (CAM). Puesto que se ha demostrado que HGF se sinergiza con VEGF en la angiogénesis (Xin et al., Am. J. Pathol. 158:1111, 2001), estos análisis

22 23

pueden ser efectuados tanto en presencia como en ausencia de VEGF.

El análisis de proliferación de HUVEC se efectúa como se describe con una modificación (Conn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 87:1323, 1990). Células HUVEC obtenidas de Clonetics son cultivadas en medio de cultivo endotelial (EBM-2) que contiene 10% de FCS más complemento de cultivo celular endotelial proporcionados por Clonetics. Preferiblemente, las células de los pasajes 4 a 7 son usados en este estudio. Las células son resuspendidas para ser de 10^5 células/ml en medio-199 que contiene antibióticos, 10 mM HEPES y 10% de FCS (medio de análisis). Células HUVEC (50 μ l/cavidad) son agregadas a cavidades de microtítulo que contienen una concentración apropiada de HGF con varias concentraciones de mAbs anti-HGF durante 1 hora a 37°C. Después que las células son incubadas durante 72 horas a 37°C en 5% de CO₂, se determina el nivel de proliferación celular mediante la incorporación de ³H-timidina durante 4 horas. A concentraciones suficientes, el mAb L2G7 inhibirá extensa o completamente la proliferación inducida por HGF de los HUVEC, y mAbs L2C7 y L1H4 puede por lo menos inhibir parcialmente la proliferación.

Alternativamente, el nivel de proliferación cloruro puede ser determinado mediante el análisis de MTT colorimétrico bien conocido. Las células HUVEC (10^4 células/100 μ l/cavidad) son cultivadas en medio libre de suero durante 24 horas y luego

incubadas con 100 μ l de 50 ng/ml de HGF (predeterminada para ser una cantidad sub-óptima) con varias concentraciones de mAb L2G7 durante 72 horas. Se agrega solución de MTT (5 mg/ml) a cada cavidad (20 μ l/200 μ l de medio) durante 4 horas. Luego 100
5 μ l de medio/cavidad son separados y mezclados con 100 μ l/cavidad de alcohol isopropílico acidificado (HCl 0.04 N en isopropilo). Las placas son leídas sobre un lector de ELISA a 560 nm. El % de respuesta máxima es calculada como sigue: [OD de HGF + células tratadas con mAb - OD de células sin tratar] /
10 [OD de HGF de células tratadas - OD de células sin tratar] x 100. La Figura 10 muestra que aún a un exceso molar duplicado de L2G7 mAb bloquea extensamente la proliferación de HUVEC en respuesta a HGF.

El análisis de tubo endotelial es llevado a cabo
15 esencialmente como se describe (Matsumura, et al., J. Immunol. 158:3408, 2001; Xin et al., Am. J. Pathol. 158:111, 2001). HUVEC (Clonetics) de los pasajes 4-7 son cultivadas en medio de EGM Clonetics complementado con 10% de FBS y complementos de cultivo celular endotelial. Las placas son recubiertas con
20 Matrigel (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante a 37°C durante 30 minutos y las células son sembradas como 3×10^6 células/ml en 1 x de medio basal con HGF y varias concentraciones de mAbs anti-HGF. La formación del tubo es evaluada bajo el microscopio a una amplificación de
25 baja potencia (10x). A concentraciones suficientes, el mAb L2G7

inhibirá extensa o completamente la formación de tubo endotelial inducida por HGF y los mAbs L2C7 y L1H4 pueden por lo menos inhibirlo parcialmente.

El análisis de membrana corioalantoica de embrión de pollo (CAM) se efectúa esencialmente como se describe (Kim et al., Nature 362:841, 1992). Embriones de pollo de tres días son retirados de sus cáscaras y cultivados en cajas de Petri en 5% de CO₂ a 37°C. Siete días más tarde, los discos de metilcelulosa secos que contienen HGF con varias concentraciones de mAbs anti-HGF son estratificados sobre el CAM. Las cajas de metilcelulosa son preparadas al mezclar 5 µl de 1.5% de metilcelulosa en PBS con 5 µl de HGF preincubado con mAbs. Tres días más tarde el desarrollo de vasos sanguíneos alrededor de las cajas de metilcelulosa es examinado. A concentraciones suficientes, el mAb L2G7 inhibirá extensa o completamente tal formación de vasos sanguíneos y los mAbs L2C7 y L1H4 pueden inhibirlo por lo menos parcialmente.

También se reporta que el HGF promueve el crecimiento de tumor (Comoglio y Trusolino, J. Clin. Invest. 109:857, 2002). La capacidad de los anticuerpos anti-HGF para inhibir esta actividad es demostrada en dos etapas. En primer lugar, un número de líneas de célula de tumor son examinadas en cuanto a su capacidad para segregar HGF y proliferar en respuesta a HGF puesto que HGF puede ser un factor de crecimiento autocrino para algunas de estas células. Estas las celulares incluyen un

panel de línea de célula de tumor humano que se sabe que expresan HGF y cMet (Koochekpour et al., Cancer Res. 57:5391, 1997; Wang et al., J. Cell. Biol. 153:1023, 2001). Las líneas celulares específicas a ser probadas incluyen glioma U-118, carcinoma de colon HCT116, carcinoma de pulmón A549 y células de carcinoma epidermoides A431, todas disponibles de la ATCC. Una vez que tales líneas de células de tumor son identificadas, el efecto de los mAbs anti-HGF sobre la respuesta proliferativa a HGF de estas células es determinado, utilizando métodos similares a aquellos descritos anteriormente. A concentraciones suficientes, el mAb L2G7 inhibirá extensa o completamente la proliferación inducida por HGF de muchas o todas de estas líneas celulares y los mAbs L2C7 y L1H4 pueden inhibir por lo menos parcialmente la proliferación.

Por ejemplo, células de tumor HCT116 humanas son sembradas en placas de microtítulo de 96 cavidades a 5×10^3 células/cavidad en 200 μ l de DMEM más 5% de FCS. Después de una incubación de 24 horas a 37°C en 5% de CO₂, las células son lavadas con PBS e incubadas en DMEM libre de suero durante 48 horas. Luego las células son incubadas con 100 ng/ml de HGF +/- 20 μ g/ml de mAbs en DMEM por otras 20 horas. Como controles, células cultivadas en DMEM solo o DMEM más 10% de FCS son incluidas. Al final de la incubación, los niveles de proliferación celulares son determinados mediante incorporación de ³H-timidina durante 4 horas. El resultado de tal experimento

26

se efectúa por triplicado como se muestra en la figura 11. HGF indujo una proliferación moderada de las células HCT116, la cual fue abolida completamente mediante la adición del anticuerpo L2G7 (pero no por el anticuerpo L1H4 menos potente).

5 En todos los análisis descritos anteriormente, cada anticuerpo anti-HGF neutralizará o inhibirá la actividad cuando sea usado solo sin otros antagonistas de HGF, esto es, como un solo agente, pero efectos aditivos o sinérgicos pueden ser obtenidos al administrar el anticuerpo en conjunción con otros
10 anticuerpos anti-HGF u otros agentes activos.

4. Capacidad de los mAbs anti-HGF para Inhibir el Crecimiento de Tumor In Vivo

La capacidad de los anticuerpos anti-HGF para inhibir
15 el crecimiento de tumor humano se demuestra en modelos de xenoinjerto en ratones inmunodeficientes u otros roedores, tales como rata. Ejemplos ilustrativos pero no limitantes de cepas inmunodeficientes de ratones que pueden ser usados son ratones desnudos tales como CD-1 desnudo, Nu/Nu, Balb/c
20 desnudo, NIH-III (NIH-bg-nu-xid BR); ratones scid tales como Fox Chase SCID (C.B-17 SCID), Fox Chase outbread SCID y SCID Beieg; ratones deficientes en enzima RAG; también como ratas desnudas. Los experimentos son llevados a cabo como se describe previamente (Kim et al., Nature 362:841, 1992, que es
25 incorporado en la presente por referencia). Células de tumor

humano cultivadas en medio de DMEM completos son cosechadas en HBSS. Ratones inmunodeficientes hembra, por ejemplo ratones desnudos atímicos (de 4-6 semanas) son inyectados s.c. comúnmente con 5×10^6 células en 0.2 ml de HBSS en las áreas dorsales. Cuando el tamaño del tumor llega a 50-100 mm³, los ratones son agrupados aleatoriamente y cantidades apropiadas de los anti-HGF y mAbs de control (comúnmente entre 0.1 y 1.0 mg, por ejemplo 0.5 mg) son administrados i.p. una vez, dos veces o tres veces por semana en un volumen de por ejemplo 0.1 ml, durante por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 semanas o la duración del experimento. Los tamaños de tumor son determinados comúnmente dos veces a la semana al medir en dos dimensiones [longitud (a) y ancho (b)]. El volumen del tumor es calculado de acuerdo con $V = ab^2/2$ y expresado como volumen de tumor promedio $\pm$ SEM. El número de ratones en cada grupo de tratamiento es por lo menos 3, pero más frecuentemente entre 5 y 10, por ejemplo 7. El análisis estadístico puede ser efectuado utilizando por ejemplo la prueba de t de Student. En una variación de este experimento, la administración del anticuerpo comienza simultáneamente o brevemente después de la inyección de las células de tumor. El efecto del anticuerpo puede también ser medido por la prolongación de la sobrevivencia de los ratones o incremento en % de los ratones que sobreviven.

Varias líneas de células de tumor se sabe que segregan o responden a HGF son usadas en experimentos

separados, por ejemplo células de glioblastoma humanas U-118 y/o células de tumor de colon humano HCT116. Los anticuerpos preferidos de la invención, tales como anticuerpos semejantes a humano y de inmunogenicidad reducida y el anticuerpo L2G7 y sus formas quiméricas y humanizadas y anticuerpos con el mismo epítipo como L2G7, cuando son usados como un solo agente, inhibirán el crecimiento de tumores por al menos 25%, pero posiblemente 40% o 50% y tanto como 75% o 90% o mayor o aún inhiben completamente el crecimiento del tumor después de algún período de tiempo o provocan regresión del tumor o desaparición. Esta inhibición tomará lugar por al menos línea de célula de tumor tal como U118 en por lo menos una cepa de ratón tal como ratón Beige/Desnudo NIH III, pero preferiblemente ocurrirá durante 2, 3, varias, muchas o aún esencialmente todas las líneas de célula de tumor que expresan HGF de un tipo particular (por ejemplo glioma) o cualquier tipo, cuando son probados en una o más cepas de ratón inmunodeficientes que no generan una respuesta de anticuerpo neutralizante contra el anticuerpo inyectado. El tratamiento con algunos anticuerpos preferidos en uno o más de los modelos de xenoinjerto conduce a la sobrevivencia indefinida de 50%, 75%, 90% o aún esencialmente todos los ratones, que de otra manera morirían o necesitarían ser sacrificados debido al crecimiento de su tumor.

Por ejemplo, tal experimento fue efectuado con

células de glioblastoma U-118, cultivadas en medio DMEM con FCS y cosechadas en HBSS. Ratones Beige/Desnudo NIH III hembras (4-6 semanas) son inyectados s.c. con 10^6 células en 0.2 ml de HBSS en las áreas dorsales. Cuando el tamaño del tumor llega a ~50 mm³, los ratones son agrupados aleatoriamente en dos grupos de 6 ratones cada uno y se administran 200 µg de mAb de L2G7 (grupo de tratamiento) o de PBS (grupo de control) i.p. dos veces a la semana en un volumen de 0.1 ml. Los tamaños del tumor son determinados dos veces a la semana como se describe anteriormente. Al final del experimento, los tumores son extirpados y pesados. La figura 12 muestra que el tratamiento con L2G7 inhibe completamente el crecimiento del tumor.

Experimentos de inhibición de tumor similares son efectuados con el anticuerpo anti-HGF administrado en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos tales como 5-FU (5-fluorouracilo) o CPT-11 (Camptosar) a los cuales el tipo de tumor se espera que sea sensible, como se describe por Ashkenize et al., J. Clin. Invest. 104:155, 1999. La combinación del anticuerpo y fármaco quimioterapéutico puede producir una inhibición mayor de crecimiento de tumor que ya sea uno u otro agente solo. El efecto puede ser aditivo o sinérgico e inhibir fuertemente el crecimiento, por 80% o 90% o más o aún provocar regresión o desaparición del tumor. El anticuerpo anti-HGF puede también ser administrado en combinación con un anticuerpo contra otro factor de crecimiento

db

o factor angiogénico, por ejemplo anti-VEGF y se espera la inhibición de crecimiento aditiva o sinérgica y/o regresión o desaparición del tumor.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a las modalidades actualmente preferidas, se debe entender que varias modificaciones se pueden efectuar sin desviarse de la invención. A no ser que se sea de otra manera evidente a partir del contexto de cualquier etapa, elemento, modalidad o elemento o aspecto de la invención puede ser usado con otro.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas son incorporadas en la presente por referencia en su totalidad para todos los propósitos a la misma extensión como si cada publicación, patente y solicitud de patente individual fuera indicada específica e individualmente a ser incorporada por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

47

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se enlaza y neutraliza el factor de crecimiento de hepatocito humano.
2. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la
5 reivindicación 1, caracterizado porque es quimérico.
3. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque es humanizado.
4. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque es humano.
- 10 5. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque inhibe el enlace del factor de crecimiento de hepatocito a cMet por al menos 50%.
6. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque inhibe la dispersión
15 inducida por el factor de crecimiento de hepatocito de células de riñón caninas Madin-Darby.
7. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque inhibe la proliferación inducida por el factor de crecimiento de hepatocito de células
20 HUVEC.
8. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque inhibe la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento de hepatocito.
9. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la
25 reivindicación 1, caracterizado porque neutraliza todas las

actividades biológicas del factor de crecimiento de hepatocito.

10. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque inhibe el crecimiento de un xenoinjerto de tumor humano en un ratón.

5 11. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque inhibe completamente el crecimiento de un xenoinjerto de tumor humano en un ratón.

12. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque es un Fab o fragmento
10 $F(ab')_2$ o anticuerpo de una sola cadena.

13. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se enlaza específicamente con HGF con una afinidad de enlace de por lo menos $10^8 M^{-1}$.

15 14. Un anticuerpo L2G7 mAb caracterizado porque es quimérico o humanizado.

15. Un anticuerpo caracterizado porque compite por el enlace al HGF humano con un anticuerpo de conformidad con la reivindicación 14.

20 16. Una línea celular caracterizada porque produce el anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1.

17. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 14.

25 18. Un método para el tratamiento de cáncer en un

99

paciente caracterizado porque comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-HGF neutralizante.

19. El método de conformidad con la reivindicación
5 18, caracterizado porque el cáncer es glioblastoma.

20. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo L2G7 quimérico o humanizado.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención es concerniente con un anticuerpo monoclonal neutralizante al factor de crecimiento de hepatocito, una composición farmacéutica que comprende el mismo
5 y métodos de tratamiento que comprenden administrar tal composición farmacéutica a un paciente, tal como para inhibir glioblastoma.

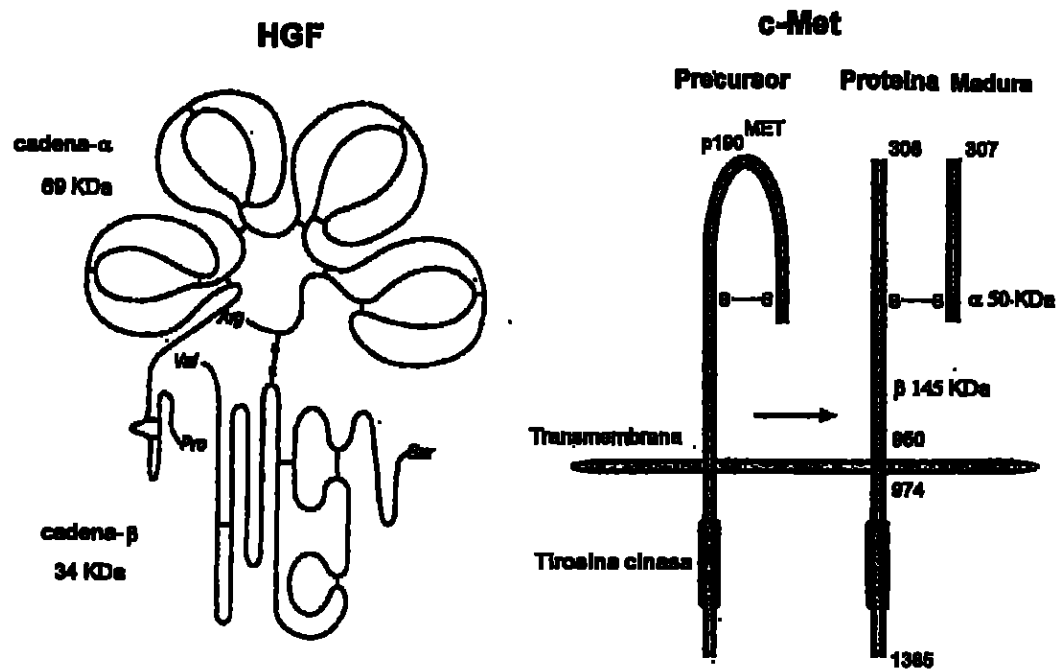


FIG 1

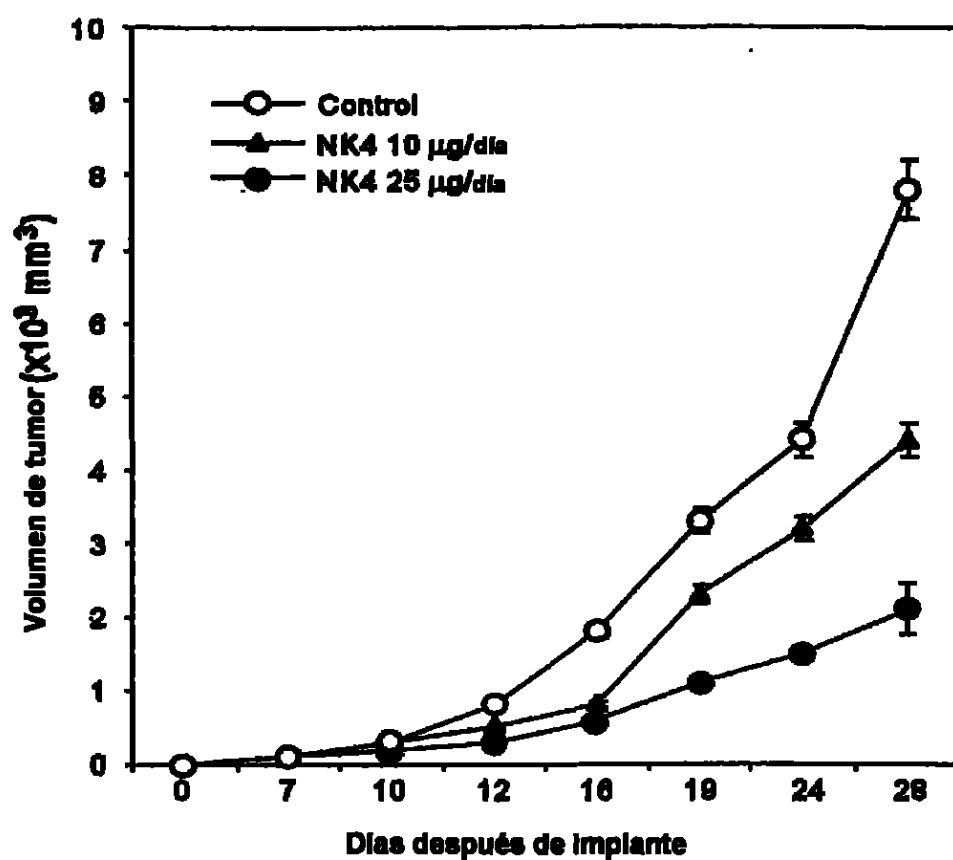


FIG 2

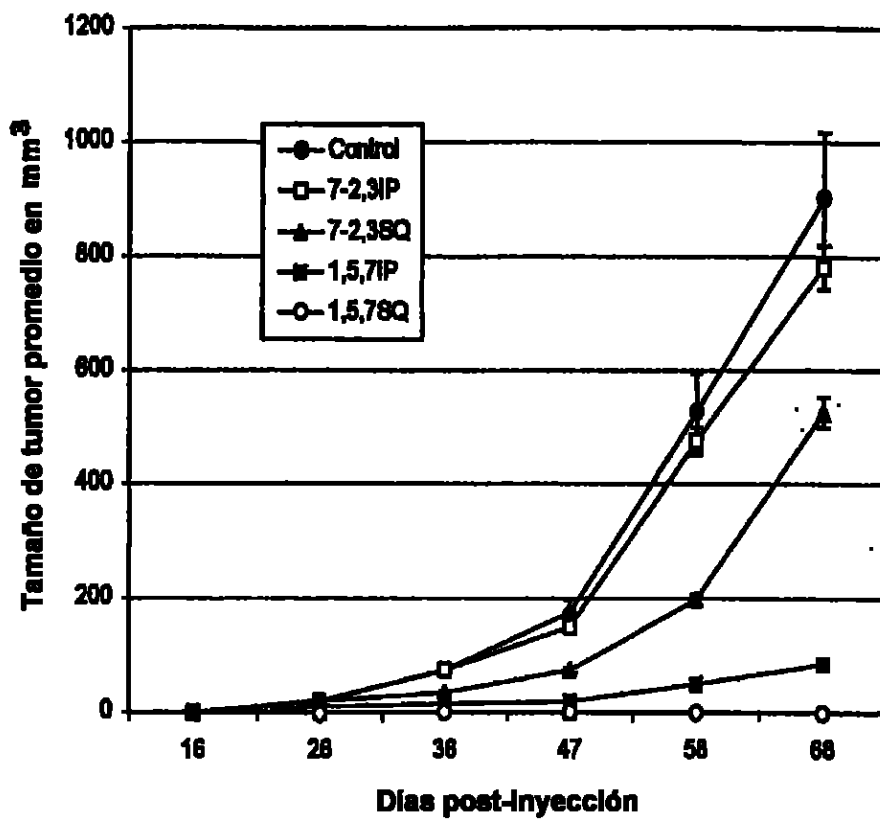


FIG 3

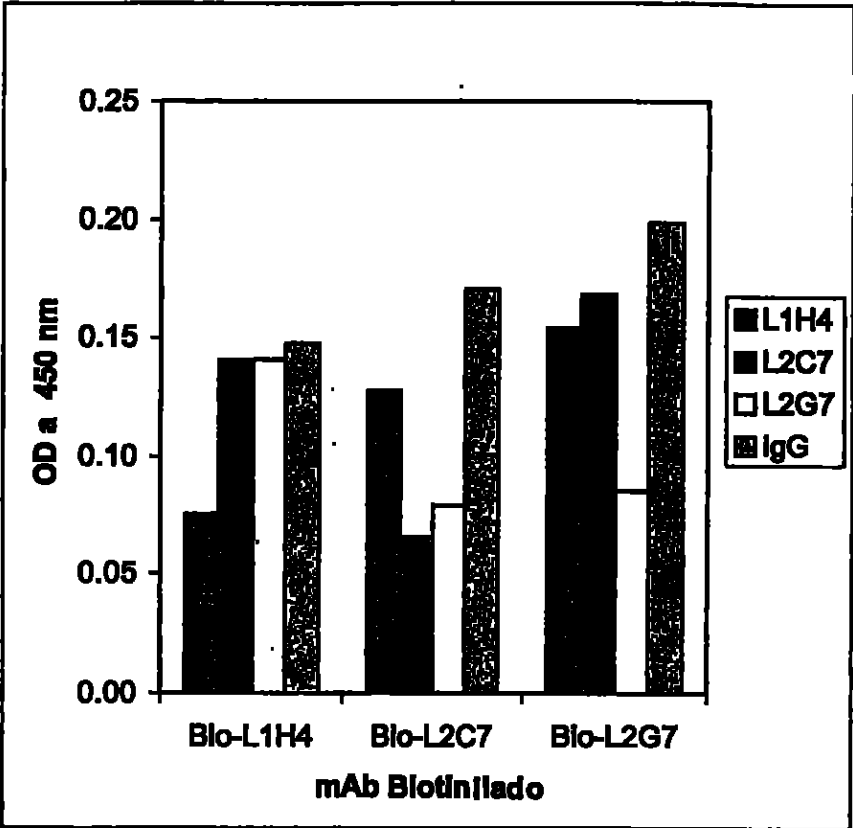


FIG 4

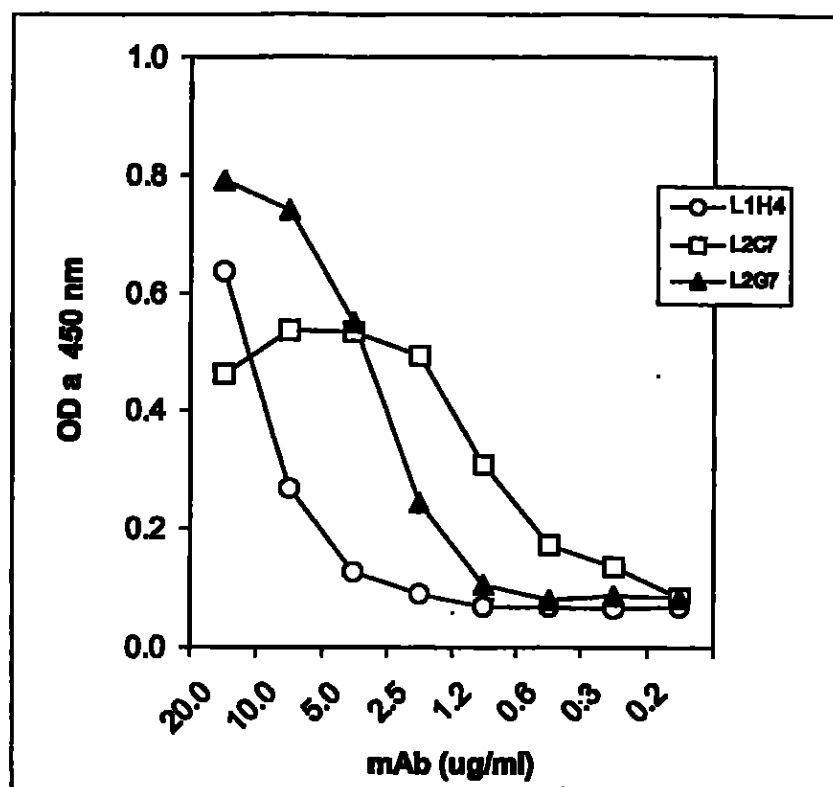


FIG 5

5/12

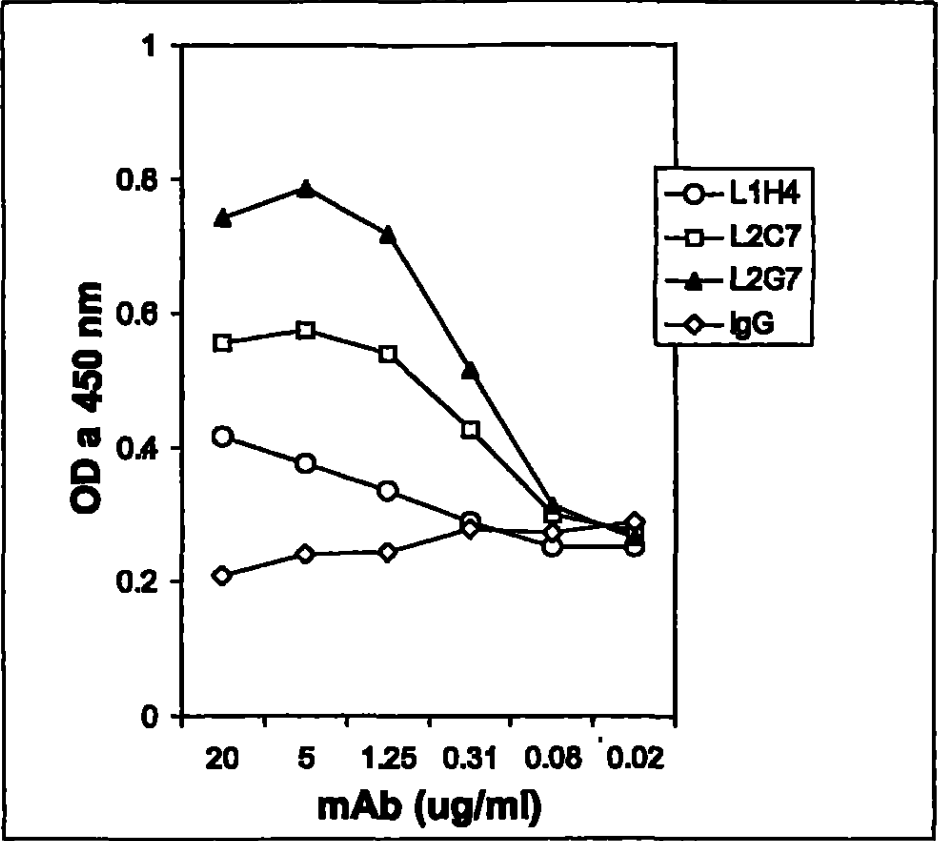


FIG 6

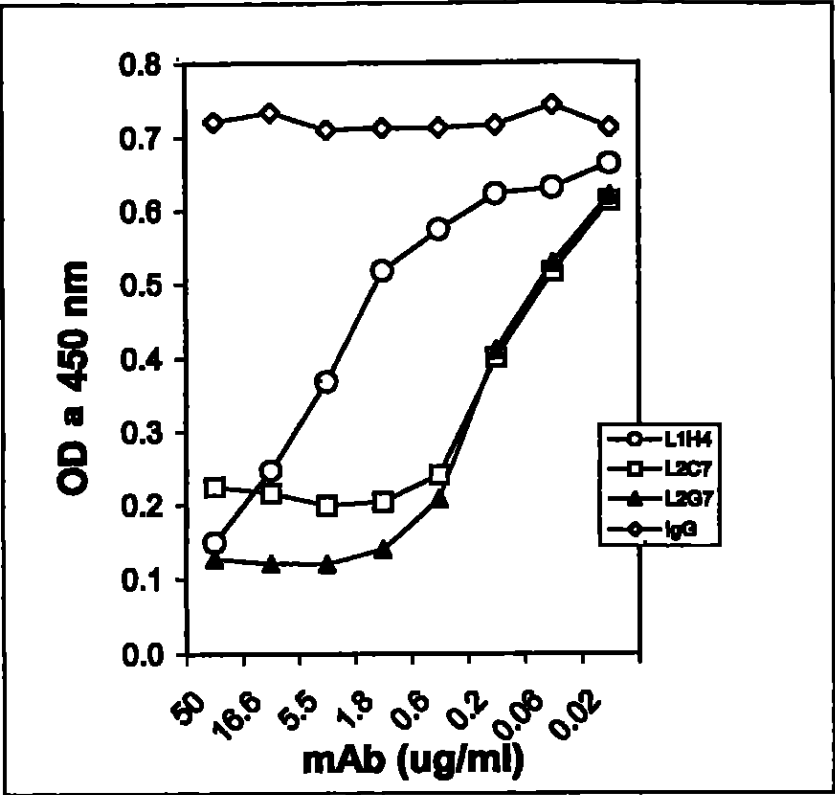


FIG 7

A



NINGUNO

B



HGF + IgG

C



-IGF + L2G7

FIG 8

8/12

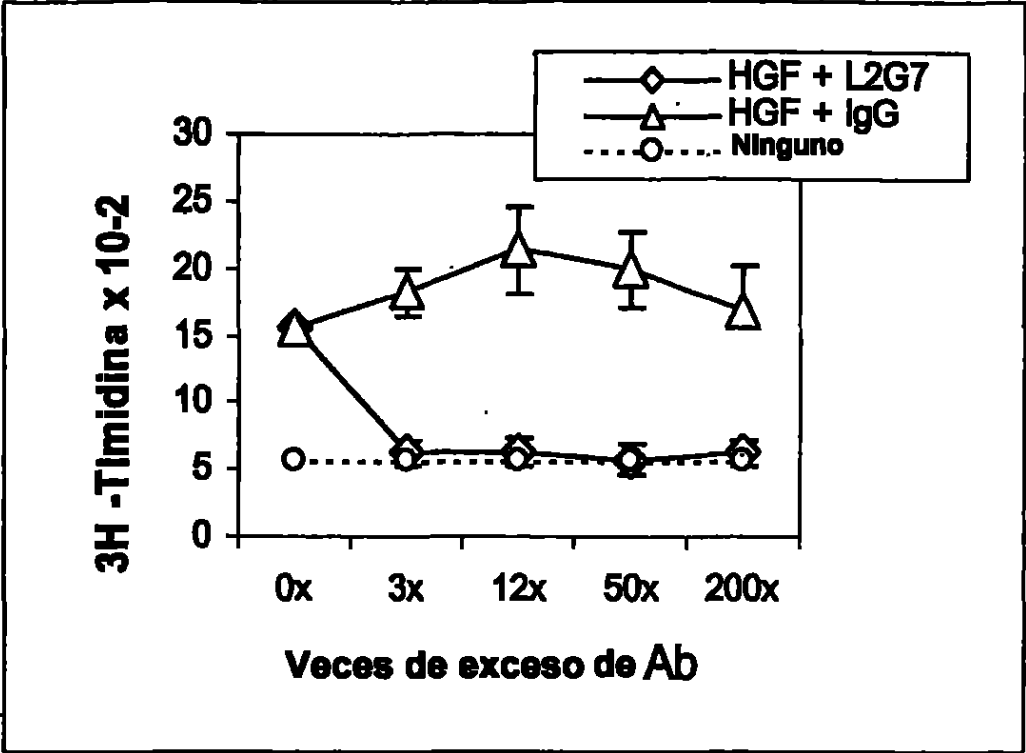


FIG 9

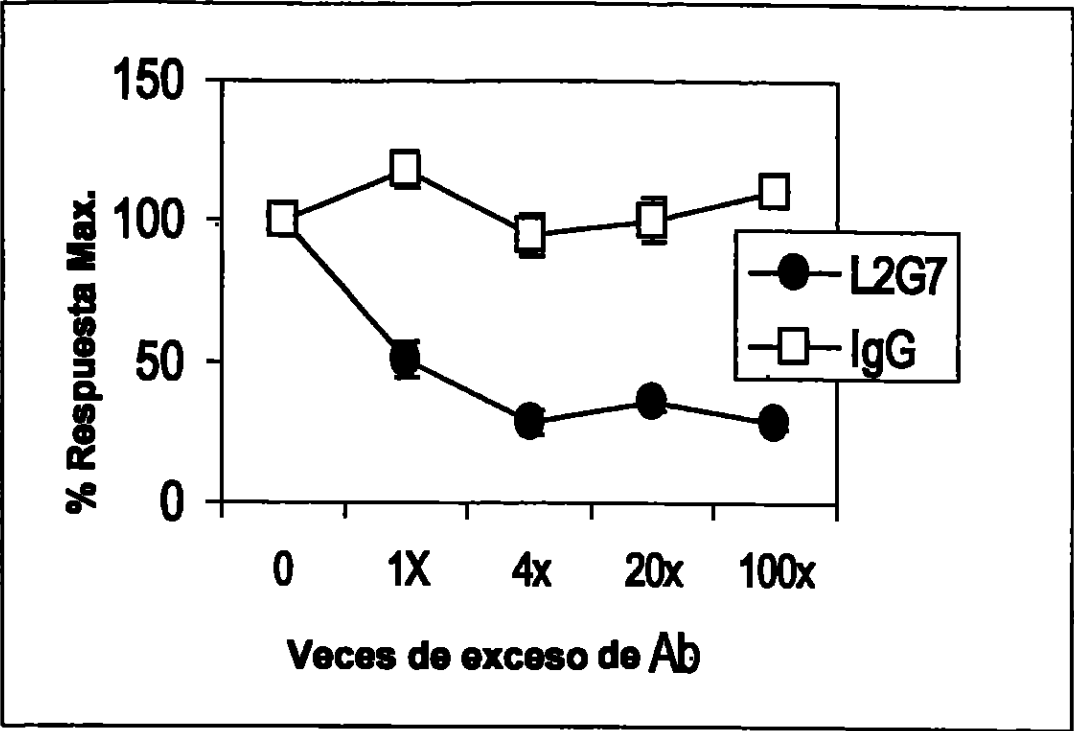


FIG 10

10/12

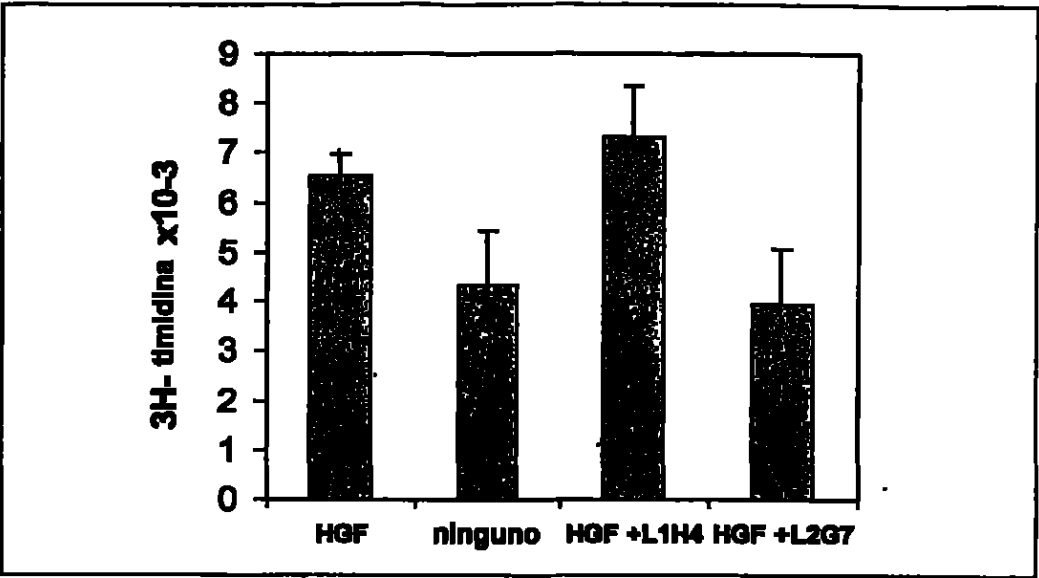


FIG 11

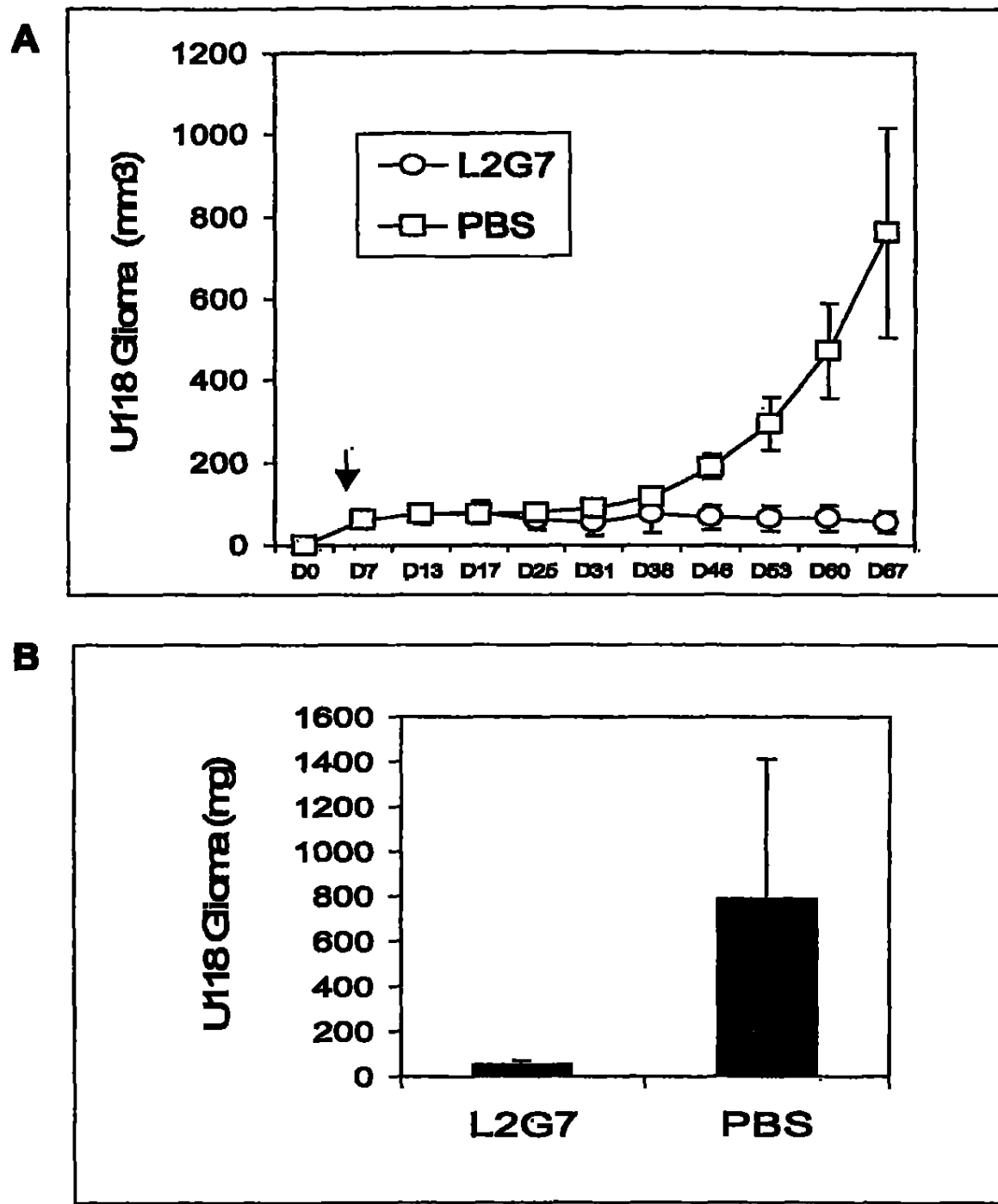


FIG 12

30L 113 PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
JOE LIEBESCHUETZ
TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW LLP
TWO EMBARCADERO CENTER
8TH FLOOR
PALO ALTO, CA 94111-3834

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

022382 - 000120PC

Date of mailing
(day/month/year) 07 JAN 2005

Applicant's or agent's file reference
22382-1-2PC

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/US04/26363

International filing date
(day/month/year) 13 August 2004 (13.08.2004)

Applicant
KIM ET AL.

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 740 14 35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices. 10/15/06

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

James L. Grun

Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/220 (January 2004)

(See notes on accompanying sheet)

Search report rec'd
Comment on abstract 2/7/05
Article 19 3/7/05
File IDS 4/7/05
DOCKETED 2/6

Written opinion rec'd
Written opinion response 3/7/05
DOCKETED 2/6

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 22382-1-2PC	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US04/26565	International filing date (day/month/year) 13 August 2004 (13.08.2004)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 15 April 2004 (15.04.2004)
Applicant KIM ET AL.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).



With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box No. III)

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 12



as suggested by the applicant.



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

2004

511

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/26363

Box IV TEXT OF THE ABSTRACT (Continuation of Item 5 of the first sheet)

NEW ABSTRACT

The present invention is directed toward a neutralizing monoclonal antibody to hepatocyte growth factor, a pharmaceutical composition comprising same, and methods of treatment comprising administering such a pharmaceutical composition to a patient, such as for inhibiting glioblastoma (Fig. 12).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/26565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 39/395; C07K 16/22; C12N 5/20; G01N 33/53, 33/563, 33/574, 33/577		
US CL : 424/145.1, 152.1, 156.1; 435/7.1, 335, 336, 344.1; 436/503, 512; 530/387.3, 388.23, 388.24, 388.85		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/145.1, 152.1, 156.1; 435/7.1, 70.21, 452, 335, 336, 344.1; 436/503, 512, 548; 530/387.3, 388.23, 388.24, 388.85		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BURR et al. Anti-Hepatocyte Growth Factor Antibody Inhibits Hepatocyte Proliferation During Liver Regeneration. Journal of Pathology. 1998, Vol. 185, No. 3, pages 298-302, see entire document.	1,16
—		
Y		1-13,15,16,18,19
X	DI NICOLA et al. Human Bone Marrow Stromal Cells Suppress T-Lymphocyte Proliferation Induced by Cellular or Nonspecific Mitogenic Stimuli. Blood. 15 May 2002, Vol. 99, No. 10, pages 3838-3843, see especially pages 3839, col. 2, and 3842, col. 1.	1,16
—		
Y		1-13,15,16,18,19
Y	CAO et al. Neutralizing Monoclonal Antibodies to Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF) Display Antitumor Activity in Animal Models. Proceedings of the National Academy of Science USA. 19 June 2001, Vol. 98, No. 13, pages 7443-7448, see entire document.	1-13,15,16,18,19
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 02 December 2004 (02.12.2004)		Date of mailing of the international search report 07 JAN 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>James L. Grun</i> James L. Grun Telephone No. 571-272-1600

6/1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/26565

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST, DIALOG
search terms: hepatocyte growth factor, HGF, neutraliz?, monoclonal, antibod?

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
JOE LIEBESCHUETZ
TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW LLP
TWO EMBARCADERO CENTER
8TH FLOOR
PALO ALTO, CA 94111-3834

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year)

07 JAN 2005

Applicant's or agent's file reference

22382-1-2PC

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US04/26565

International filing date (day/month/year)

13 August 2004 (13.08.2004)

Priority date (day/month/year)

15 April 2004 (15.04.2004)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(7): A61K 39/395; C07K 16/22; C12N 5/20; G01N 33/53, 33/563, 33/574, 33/577 and US Cl.: 424/145.1, 152.1, 156.1; 435/7.1, 335, 336, 344.1; 436/503, 512; 530/387.3, 388.23, 388.24, 388.85

Applicant

KIM ET AL.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/ US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

James L. Grun

Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (January 2004)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US04/26565

5/1

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material

☐ a sequence listing

☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐ in written format

☐ in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐ contained in international application as filed.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US04/26565

Box No. V Reasoned statement under Rule 43 bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims <u>2-15,17-20</u>	YES
	Claims <u>1,16</u>	NO
Inventive step (IS)	Claims <u>14,17,20</u>	YES
	Claims <u>1-13,15,16,18,19</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims <u>1-20</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-20 meet the criteria set out in PCT Article 33(4) for industrial applicability.

Claims 14, 17 and 36 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest the L2G7, PTA-5162, monoclonal anti-hepatocyte growth factor antibody or methods for its use.

Claims 1 and 16 lack novelty under PCT Article 33(2) as being clearly anticipated by Burr et al. (J. Pathol. 185: 298, 1998).

Burr et al. teach the D9 anti-hepatocyte growth factor (HGF) monoclonal antibody which neutralizes HGF activity in vivo.

Claims 1 and 16 lack novelty under PCT Article 33(2) as being clearly anticipated by Di Nicola et al. (Blood 99: 3838, 2002).

Di Nicola et al. teach a monoclonal anti-hepatocyte growth factor (HGF) monoclonal antibody which neutralizes HGF activity.

Claims 1-13, 15, 16, 18, and 19 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over either of Burr et al. (J. Pathol. 185: 298, 1998) or Di Nicola et al. (Blood 99: 3838, 2002), in view of Cao et al. (PNAS 98: 7443, 2001).

The teachings of Burr et al. or Di Nicola et al. are as set forth above and differ from the invention as instantly claimed in not teaching humanized antibodies or alternative activities inhibited by the disclosed neutralizing anti-HGF monoclonal antibodies.

Cao et al. teach a variety of assays to determine the neutralizing activities of monoclonal anti-HGF antibodies.

It would have been obvious to have tested the antibodies of either of Burr et al. or Di Nicola et al. in the assays of Cao et al. to confirm the activities of the antibodies as neutralizing in other assays therefor. One would have expected the antibodies to function in other neutralization assays in view of their demonstrated activity in another assay therefor. Humanization of a known antibody is within the skill of one in the art.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US04/26565

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the questions whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 1-13, 15, 16, 18, and 19 are objected to as lacking clarity under PCT Rule 66.2(a)(v) because the claims are not fully supported by the description. The description does not disclose the claimed invention in a manner sufficiently clear and complete for the claimed invention to be carried out by a person skilled in the art because: applicant's disclosure of the PTA-5162 hybridoma and antibodies produced thereby does not provide adequate description or guidance for any and every other monoclonal antibody having the recited binding characteristics. Moreover, one cannot envision, make, and use a humanized antibody other than one based upon the disclosed antibody species because one cannot make a humanized or chimeric antibody with given binding characteristics if the structure of the original antibody is unknown and unpredictable absent further unpredictable experimentation.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

022382-000120PC

LIEBESCHUETZ, Joe
Townsend and Townsend and Crew LLP
Two Embarcadero Center
8th Floor
San Francisco, California 94111-3834
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 07 December 2004 (07.12.2004)	
Applicant's or agent's file reference 22382-1-2PC	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US04/028565	International filing date (day/month/year) 13 August 2004 (13.08.2004)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 15 April 2004 (15.04.2004)
Applicant KIM, Kyung, Jin et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(e) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(e) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
15 April 2004 (15.04.2004)	10/825,080	US	04 October 2004 (04.10.2004)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Mulhausen Dorothee

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Facsimile No. +41 22 338 87 40
Telephone No. +41 22 338 9672

Form PCT/IB/304 (January 2004)

Priority doc
UNDOCKETED BY 364



Expediente No		06110246.	No de Folia
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA	1	
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones: Arte final)

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PCT

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x]
- ◆ Descripción de la invención [x]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha 30 de oct 2006

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia