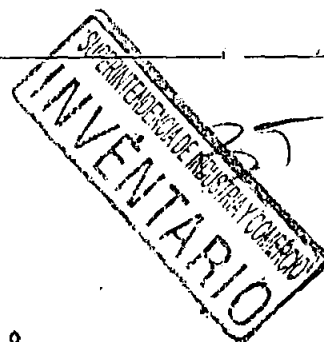




CSA220978

Organización y
Digitalización CSA Ltda



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

08-124719

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: ANTICUERPOS BLOQUEANTES DE LA FUNCIÓN DE LA INTEGRINA
 $\alpha 5 \beta 1$ HUMANOS Y HUMANIZADOS DE GRAN AFINIDAD CON
INMUNOGENICIDAD REDUCIDA

SOLICITANTE: BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT, y
MORPHOSYS AG

DIRECCIÓN: Müllerstrasse 178, 13353, Berlin Alemania ; y Lena-Christ-Str.
48, 82152 Martinsried/Planegg Alemania

APODERADO: J. IAN RAISBECK

BOGOTÁ 24 de Noviembre de 2008

99

OlarteRaisbeck



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-124719- -00000-0000
Fecha: 2008-11-24 15:53:48 Dep. 2020 NUECREACION
Ltr. 11 PATENTE I/II Evt: 379 FASE NACIONAL II
Act 411 PRESENTACION Folios: 186

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 2h de 2008 P2008/000205

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: BAYER SCHERING PHARMA
AKTIENGESELLSCHAFT y MORPHOSYS AG

Dirección: Müllerstrasse 178, 13353 Berlín,
Alemania, y Lena-Christ-Str. 48, 82152
Martinsried/Planegg Alemania

Nacionalidad o Domicilio: Alemania

Lugar de Constitución: Alemania

Teléfono: _____ **Fax:** _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: J. IAN RAISBECK

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

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.376.996 Btá
TP 135.799

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2007/004648

Fecha Mayo 21, 2007

Publicación Internacional No. WO 2007/134876

Fecha Noviembre 29, 2007

6

Título (54) ANTICUERPOS BLOQUEANTES DE LA FUNCIÓN DE LA INTEGRINA
α5β1 HUMANOS Y HUMANIZADOS DE GRAN AFINIDAD CON INMUNOGE-
NICIDAD REDUCIDA

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28, A61K 39/395, A61P 35/00, C12N
15/63, A01K 67/027

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

Mayo 24, 2006

(31) Número de Solicitud

06010779.4

9

Comprobante de pago No. 08-91,028

Fecha Noviembre 21 de 2008

10

ANEXOS

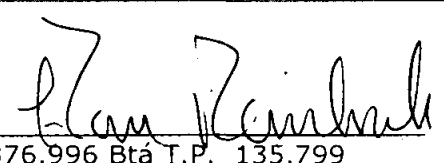
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. **08-046.634**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros. Búsqueda Internacional

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: J. IAN RAISBECK

FIRMA:

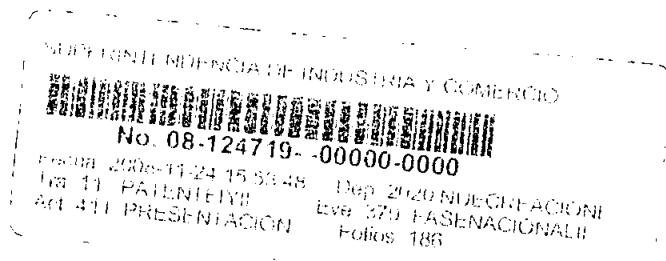


C.C. 79.376.996 Btá T.P. 135.799

LISTA DE INVENTORES

PCT/EP2007/004648

1. **Andreas MENRAD**,
141 Mainstreet Witchford,
Ely Cambs, Cambridgeshire CB6 2HP
Gran Bretaña
Nacionalidad: Alemana
2. **Jörg WILLUDA**,
Platanenstr. 3,
13156 Berlin
Alemania
Nacionalidad: Alemana
3. **Klaus BOSSLET**,
Im Amseltal 57, 1
3465 Berlin
Alemania
Nacionalidad: Alemana
4. **Dieter ZOPF**,
Neuwerker Weg 15a,
14167 Berlin
Alemania
Nacionalidad: Alemana
5. **Heike PETRUL**,
Richard-Sorge Strasse 72,
10249 Berlin
Alemania
Nacionalidad: Alemana
6. **Stefan STEIDL**,
Planegger Str. 37,
81241 München
Alemania
Nacionalidad: Alemana
7. **Josef PRASSLER**,
Kriegerstrasse 8a,
82110 Germering
Alemania
Nacionalidad: Alemana
8. **Corinne PETIT-FRÈRE**,
Freibadstr. 20a,
81543 München
Alemania
Nacionalidad: Francesa



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

LIBRO OFICIAL DE CAJA : 08 - 91,028
FECHA : NOVIEMBRE 21 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	11592416	21/11/2008	4,694,000.00

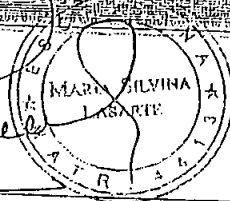
***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



N 007422051

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

CECBA - LEY 404 GCBA

LEGAL: ACCION

070312117346



\$20.00

12/03/2007

13:51:46

CECBA - LEY 404 GCBA

LEGAL: INTERVENE

070312054713



\$39.00

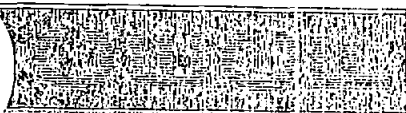
12/03/2007

13:51:54



N 007422051

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



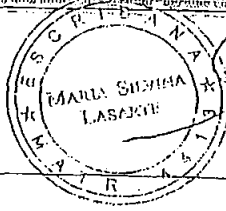
6

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



N 007422052

a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar, recusar, apelar, transar, 26
someter a arbitraje o mediación, hacer renunciaciones, exigir y dar cauciones, pedir embar- 27
gos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, pedir la venta de los 28
bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de sentencias, prestar ju- 29
ramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en general practicar 30
todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este mandato. Podrán 31
asimismo substituir el presente poder en todo o en parte.- Dado y firmado en Berlín 32
(Sigue fecha en idioma inglés). Bayer Schering Pharma AG (Sigue texto en idioma 33
inglés). ppa. Sigue una firma ilegible. (Aclarado:) Dr. Noeske-Jungblut. ppa. Sigue 34
otra firma ilegible. (Aclarado:) Dr. Klose". ES COPIA FIEL, doy fe.- En hoja adjunta 35
consta la certificación notarial de las firmas obrantes en el poder en idioma alemán, 36
efectuado el 22 de enero de 2007 por el Escribano Dimitri Rempen, de Berlín, Alema- 37
nia, y a continuación consta la respectiva legalización de la firma y sello del nombra- 38
do Notario (Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 39
1961), en idioma alemán, efectuado por el Presidente del Tribunal Regional de Berlín, 40
Alemania.- En hojas adjuntas sigue la referida traducción al idioma nacional la que 41
transcripta textualmente, dice: "TRADUCCIÓN PUBLICA - (Sobre papel con mem- 42
brete de "MOELLER y CO" - América Latina - Agentes de la Propiedad Intelectual - 43
figura un Poder otorgado por la Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con 44
sede en Berlín, Alemania, redactado en idioma nacional, luego del que aparecen los 45
siguientes textos, que traducidos dicen:) "BAYER SCHERING PHARMA AG" - 46
Patentes y licencias - (Firmado y Aclarado:) pp Dr. Noeske-Jungblut - pp (Firmado y 47
Aclarado:) Dr. Klose.- La versión en inglés es para su información únicamente.- Re- 48
gistro de Actas N° R 17/2007.- Me he referido a la prohibición de intervención según 49
el artículo 3, párrafo 1, N° 7, de la Ley de Certificaciones. Mi pregunta de si ha existi- 50



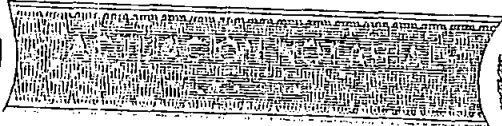
N 007422053

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



N 007422053

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



N 007422054

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

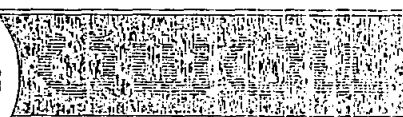
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

[Handwritten signature]



N 007422054

- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50



L 007495419

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

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

y sello del escribano MARIA SILVINA LASARTE

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

el N° 070312117346/0

La presente legalización no juzga sobre

el contenido y forma del documento.

Buenos Aires, Lunes 12 de Marzo de 2007



[Handwritten signature]

ESC. EDDA ENRIQUETA SINELLI
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA

CONSEJERO

APOSTILLE

REPUBLICA
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00115229

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por EDDA ENRIQUETA SINELLI

3. Quien actúa en calidad de CONSEJERA

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

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

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

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

invenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 070312054713

9. Sello / Timbre

10. Firma

REPUBLICA
ARGENTINA
CIUDAD DE
BUENOS AIRES



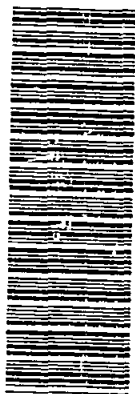
[Handwritten signature]

COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO

CECBA - LEY 404 GCBA

PROPOSICION

060426044589



\$39.00

10:15:04

26/04/2006

CECBA - LEY 404 GCBA

LEGALIZACION

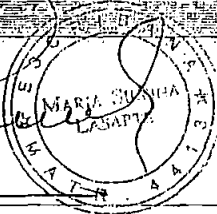
060426160758



\$20.00

10:14:56

26/04/2006



N 006133125

FOLIO 110.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: TREINTA Y NUEVE.- SUSTITUCIÓN PARCIAL DE PODER: MESSERER, Dagmar a favor de OLARTE, Carlos Reinaldo y otra del poder otorgado por MORPHOSYS AG.-----

En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, el día VEINTICINCO de ABRIL del año DOS MIL SEIS, ante mí María Silvina Lasarte,

Escribana Autorizante, titular del Registro Notarial Número 1788, **COMPARECE:**

Dagmar MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968, hija de Walter

Messerer y Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Nacional de

Identidad Número 20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria número 27-

20383892-7, domiciliada legalmente en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º,

de esta Ciudad de Buenos Aires.- La compareciente es mayor de edad y de mi

conocimiento personal, doy fe.- **INTERVIENE:** por su propio derecho.- Y la

compareciente **EXPRESA: PRIMERO:** Que la Sociedad "MorphoSys AG", con

domicilio en Lena-Christ Straße 48, D-82152 Planegg, Alemania, le confirió en dicho

país, el día el 3 de marzo de 2.006 un PODER, el cual mediante escritura número 36,

de fecha 24 de abril del corriente año, pasada ante mí, al folio 100, protocolo

corriente, de este Registro Notarial Numero 1.788, a mi cargo, fue incorporado y

transcripto al mismo, cuya primera copia, tengo para este acto a la vista, doy fe, y en

lo pertinente transcribiré en la presente.- **SEGUNDO:** La compareciente manifiesta

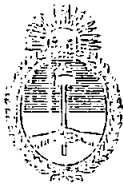
bajo juramento que el poder invocado, se encuentra plenamente vigente en virtud de

no haberle sido revocado, suspendido ni limitado en ninguna de sus partes.-

TERCERO: En consecuencia **DICE:** Que en uso de la facultad conferida

SUSTITUYE PARCIALMENTE el poder mencionado a favor de Carlos Reinaldo

OLARTE y/o James Ian RAISBECK, al solo y único objeto de que en nombre y



N 006133125

representación de la Sociedad "MorphoSys AG", y actuando en forma individual, 26
indistinta y/o alternadamente, se presenten exclusivamente ante las autoridades de 27
COLOMBIA, que correspondan y realicen los actos enumerados en el citado poder y 28
con las facultades que surgen del mismo, el que transcripto en lo pertinente dice: "... 29
ESCRITURA NÚMERO: TREINTA Y SEIS.- ... En la Ciudad Autónoma de Buenos 30
Aires, ... el día VEINTICUATRO de ABRIL del año DOS MIL SEIS, ante mí ... 31
Escribana Autorizante, titular del Registro Notarial número 1788, COMPARECE: 32
Dagmar MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968, hija de Walter 33
Messerer y Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Nacional de 34
Identidad Número 20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria número 27- 35
20383892-7, domiciliada legalmente en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, 36
de esta Ciudad de Buenos Aires.- La compareciente es mayor de edad y de mi 37
conocimiento personal, doy fe.- INTERVIENE: por su propio derecho y la 38
compareciente, EXPRESA: Que a los efectos que hubiere lugar, solicita de mí, la 39
Autorizante, LA INCORPORACIÓN y TRANSCRIPCIÓN en este protocolo del 40
PODER que le fuera conferido en Munich, Alemania, el 3 de marzo de 2006, por la 41
Sociedad "MorphoSys AG", con domicilio en Lena-Christ Straße 48, D-82152 42
Planegg, Alemania, sobre cuya plena vigencia responde la requirente bajo juramento.- 43
Yo, la Autorizante, hago constar: a) Que el instrumento de poder cuya incorporación y 44
transcripción a este protocolo solicita la compareciente, se encuentra extendido en 45
idioma inglés y castellano, certificadas las firmas y la representación por notario en 46
idioma castellano, legalizado en idioma alemán (Sello de Apostilla de la Convención 47
de La Haya del 5 de octubre de 1961) y traducido en lo pertinente al idioma nacional 48
por la Traductora Pública Laura Thieberger.- b) Que la compareciente en virtud de lo 49
manifestado tiene interés legítimo en su requerimiento.- En consecuencia, me hace 50



N 006133126

1 entrega en este acto del original del instrumento de poder relacionado con su
2 respectiva traducción al idioma nacional, el que agrego a la presente y transcripto
3 textualmente dice: "MOELLER & CO (Sigue texto en idioma inglés) - PODER Los
4 abajo firmante/s MorphoSys AG domiciliados en Lena-Christ Straße 48, D-82152
5 Planegg, Alemania declaran por el presente otorgar a Dagmar MESSERER
6 indistintamente poder general amplio y suficiente para recabar de las autoridades ...
7 sud y centroamericanas ... que correspondan, la obtención de patentes de invención,
8 el registro y la renovación de marcas y modelos y/o derechos de propiedad intelectual
9 y/o nombres de dominio, a cuyo efecto los faculta/n para llevar a cabo ante dichas
10 autoridades todas las gestiones necesarias al objeto indicado, presentar solicitudes,
11 formular descripciones, oposiciones, protestos, declaraciones, apelaciones y reclamos,
12 oblar impuestos, justificar explotaciones, solicitar testimonios, aceptar transferencias,
13 recibir documentos y valores, percibir y hacer cuanto fuere necesario ante las
14 autoridades administrativas de cualquier orden. Por otra parte, les confieren mandato
15 para que en su nombre y representación puedan iniciar y proseguir cualquier juicio
16 que actualmente los que suscriben tengan o en el futuro tuvieran ... en Sudamérica,
17 Centroamérica ..., con motivo de su nombre, marcas de fábrica o de comercio, patentes
18 de invención y modelos y/o de sus derechos de propiedad intelectual que actualmente
19 posean o adquieran en lo sucesivo, promover juicios de cualquier jurisdicción,
20 criminales, correccionales, civiles o comerciales, contra los falsificadores,
21 usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos que infrinjan su nombre,
22 marcas o patentes de invención, seguir los juicios por oposición u otros en que fueran
23 parte como actores o demandados, defender el nombre, las marcas, patentes y modelos
24 y/o de derechos de propiedad intelectual y/o nombres de dominio, haciendo las
25 protestas del caso o diciendo de nulidad. Al efecto, podrán presentarse con escritos,



N 006133126

querellas, pedidos, y lo que fuere necesario ante cualquier autoridad judicial, presentar 26
testigos, documentos y demás justificativos, rendir pruebas de cualquier especie, pedir 27
nombramientos de peritos, pedir y absolver posiciones, asistir a juicios verbales, 28
declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar, recusar, apelar, transar, someter a arbitraje 29
o mediación, hacer renunciaciones, exigir y dar cauciones, pedir embargos preventivos, 30
definitivos o inhibiciones y su levantamiento, pedir la venta de los bienes de los 31
deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de sentencias, prestar juramentos, decir 32
de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en general practicar todos los actos y 33
diligencias que sean precisos al desempeño de este mandato. Podrán asimismo 34
substituir el presente poder en todo o en parte. Dado y firmado en.- Siguen dos firmas 35
ilegibles.”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- En hoja adjunta consta la certificación notarial 36
de las firmas obrantes en el poder y de la representación invocada, realizada en idioma 37
nacional, por el Notario de la Ciudad de Munich, República Federal de Alemania, 38
Oliver Vossius, la que transcrita textualmente dice: “Repertorio No. V 440/2006.- 39
Yo, el infrascrito sustituto de Notario Dr. Vossius con vecindad en la Ciudad de 40
Munich, Republica Federal de Alemania, debidamente facultado y jurado 41
CERTIFICO ser auténticas las firmas, puestas al pie del documento anexo, por haber 42
sido suscritas dichas firmas ante mi el día de hoy por el señor y la señora Don David 43
Lernus, miembro de la junta ejecutiva, nacido el 11 de noviembre del 1962, vecino de 44
Munich, R.F.A., de nacionalidad alemana, mayor de edad, titular de tarjeta de 45
identidad, y Doña Dr. Marlies Sproll, miembro de la junta ejecutiva, nacida el 9 de 46
maio de 1958, vecino de Gauting, R.F.A., de nacionalidad alemana, mayor de edad, 47
titular de tarjeta de identidad alemana. intervienen en nombre y representación de la 48
sociedad mercantil Morphosys AG con sede social a Martinsried, comunidad de 49
Planegg, Registro Mercantil del Tribunal de Munich No. HRB 121023, con domicilio 50



ACTUACION NOTARIAL



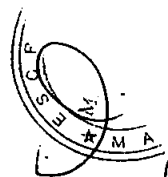
N 006133127

1 de Lena-Christ-Strasse 48, D-82152 Martinsried, Republica Federal de Alemania.
2 Certificado de representación será añadido al presente documento. Munich, viernes 3
3 de marzo de 2006.- Sigue una firma ilegible (aclarado): Dr. Oliver Vossius – Notario.
4 (Consta adherido sobre precinto un sello notarial).- CERTIFICADO NOTARIAL -
5 Según inspección del Registro Mercantil del tribunal de Munich, Republica Federal de
6 Alemania, del 2 de marzo del 2006 yo CERTIFICO Y DOY FE que allí esta
7 registrada bajo el número HRB 121023 la sociedad por acciones Morphosys AG con
8 la sede social a Martinsried, comunidad de Planegg y que los dos señores Dr. Marlies
9 Sproll y David Lemus tienen la capacidad legal necesaria para formalizar el presente
10 documento como miembros de la junta ejecutiva mancomunados de la dicha sociedad,
11 ambos teniendo la capacidad legal para intervenir en nombre y por cuenta de la dicha
12 sociedad por acciones y especialmente de firmar da dicha procura. Munich, viernes 3
13 de marzo de 2006. Sigue una firma ilegible (aclarado): Dr. Oliver Vossius – Notario.
14 (Hay un sello notarial).”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- A continuación sigue la
15 legalización de la firma y sello del notario, en idioma alemán, efectuada por el
16 Vicepresidente del Tribunal Regional de Munich I; Baviera, Thomas Spielbauer (Sello
17 de Apostilla de la Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961).- En hojas
18 adjuntas sigue la referida traducción al idioma nacional la que transcriba textualmente
19 dice: “TRADUCCIÓN PUBLICA (Sobre papel con membrete de “MOELLER & CO-
20 América Latina – Agentes de la Propiedad Intelectual, figura un Poder otorgado por la
21 Sociedad “MorphoSys AG”, con sede en Planegg, Alemania, redactado en idioma
22 nacional, a continuación del que aparecen los siguientes textos, que traducidos dicen:)
23 La versión en inglés es para su información únicamente. (A continuación figura un
24 Certificado Notarial en idioma nacional). APOSTILLA – (Convención de La Haya del
25 5 de octubre de 1961).- País: República Federal de Alemania.- Este instrumento



N 006133127

público fue firmado por el Dr. Oliver Vossius, en su carácter de Escribano, estando
provisto del sello del Escribano Dr. Oliver Vossius de Munich. Certificado en Munich
el 6 de marzo de 2006 por la Presidente del Tribunal Regional de Munich I con el N°
910 a - (Sello:) La Presidente del Tribunal Regional de Munich I, Baviera - Firma en
Sustitución (Firmado y aclarado:) Thomas Spielbauer - Vicepresidente: ES
TRADUCCIÓN FIEL de las partes pertinentes del documento de referencia que en los
idiomas inglés y alemán he tenido a la vista y he vertido al idioma nacional, en
Buenos Aires, el 12 de abril de 2006.- Hay una firma ilegible y un sello que dice:
"LAURA THIEBERGER - MATRICULA DE TRADUCTORES - ALEMÁN -
FRANCÉS - Tomo II Folio 254 (Cap.) Tomo III - 93 - (La Plata) - INGLÉS - Tomo
III: Folio 14 (Cap.) - Tomo III Folio 329 (La Plata) - COLEGIO TRADUCTORES
PÚBLICOS N° 173."- ES COPIA FIEL, doy fe.- A continuación hay un sello que
dice: "COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS DE LA CIUDAD DE BUENOS
AIRES Corresponde a la Legalización N° T4-6422/06. Sigue una firma ilegible:
MÓNICA TERESITA CASERES"- ES COPIA FIEL, doy fe.- Al dorso hay un sello
timbrador ...- A continuación sigue la legalización de la firma de la nombrada
traductora, realizada por el Colegio de Traductores Públicos de la Ciudad de Buenos
Aires, ...- ES COPIA FIEL, doy fe.- En este estado la compareciente DICE: que en la
forma expresada deja INCORPORADO y TRANSCRIPTO en este Protocolo el Poder
que agrego a la presente, solicitando de mí, la Escribana Autorizante, expida primera
copia de la presente para la nombrada apoderada Dagmar MESSERER.- ... - LEO
esta escritura a la compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad, la
firma ante mí, doy fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARIA SILVINA
LASARTE. Escribana. Está mi sello. CONCUERDA con su escritura matriz que pasó
ante mí, al folio 100 del Registro Notarial número 1788, a mi cargo. PARA LA





N 006133128

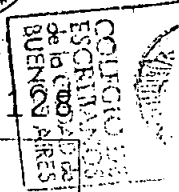
SILVINA
LASARTE

1 APODERADA expido la presente PRIMERA COPIA en tres (3) sellos de actuación
2 notarial numerados correlativamente desde el número N 006133115 al presente
3 inclusive, que sello y firmo en la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.- Sigue mi
4 firma y mi sello notarial".- **ES COPIA FIEL**, de las partes pertinentes de la escritura
5 de referencia, doy fe.- **CUARTO**: Finalmente la compareciente expresa: a) Que el
6 presente otorgamiento no significa renunciar al ejercicio de las facultades sustituidas;
7 y b) Que los nombrados apoderados sustitutos NO podrán sustituir el presente poder
8 en ninguna de sus partes.- Yo, la Escribana Autorizante advierto a la compareciente, a
9 tenor de lo dispuesto en el artículo 77 inciso h) de la Ley Orgánica Notarial Número
10 404, respecto de los alcances de las cláusulas contenidas en la presente escritura y del
11 derecho de leer por sí este instrumento.- **LEO** esta escritura a la compareciente, quien
12 así la otorga y en prueba de conformidad la firma ante mí, doy fe.- Dagmar
13 MESSERER. Ante mí: MARIA SILVINA LASARTE. Escribana. Está mi sello.
14 **CONCUERDA** con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 110 del Registro
15 Notarial número 1788, a mi cargo. PARA LA PODERDANTE expido la presente
16 **PRIMERA COPIA** en cuatro (4) sellos de actuación notarial numerados
17 correlativamente desde el número N 006133125 al presente inclusive, que sello y
18 firmo en la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.-
19
20
21
22
23
24
25

[Handwritten signature]



N 0061331



26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50



LEGALIZACION



L 006984869

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, **LEGALIZA** la firma y sello del escribano **MARIA SILVINA LASARTE** obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° **060426160758/5**. La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.

Buenos Aires, Miércoles 26 de Abril de 2006



ESC. ISAAC RAUL MOLINA
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO



APOSTILLE



REPUBLICA
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00070652

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por ISAAC RAUL MOLINA

3. Quien actúa en calidad de CONSEJERO

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

5. En LA CIUDAD DE BUENOS AIRES 6. El día 26/04/2006

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

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO
(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 060426044589

9. Sello / Timbre



10. Firma

ESC. JORGE M. LANZON
COLEGIO DE ESCRIBANOS
LEGALIZADOR



CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 November 2007 (29.11.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/134876 A2

(51) International Patent Classification:

C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Planegger Str. 37, 81241 München (DE); **PRASSLER,**
Josef [DE/DE]; Kriegerstrasse 8a, 82110 Germering (DE).
PETIT-FRÈRE, Corinne [FR/DE]; Freibadstr. 20a,
81543 München (DE).

(21) International Application Number:

PCT/EP2007/004648

(22) International Filing Date: 21 May 2007 (21.05.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

06010779.4 24 May 2006 (24.05.2006) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **BAYER
SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT**
[DE/DE]; Müllerstrasse 178, 13353 Berlin (DE).

(71) Applicant: **MORPHOSYS AG** [DE/DE]; Lena-Christ-
Str. 48, 82152 Martinsried/Planegg (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **MENRAD, An-**
dreas [DE/GB]; 141 Mainstreet Witchford, Ely Cambs,
Cambridgeshire CB6 2HP (GB). **WILLUDA, Jörg**
[DE/DE]; Platanenstr. 3, 13156 Berlin (DE). **BOSSLET,**
Klaus [DE/DE]; Im Amseltal 57, 13465 Berlin (DE).
ZOPE, Dieter [DE/DE]; Neuwerker Weg 15a, 14167
Berlin (DE). **PETRUL, Heiko** [DE/DE]; Richard-Sorge
Strasse 72, 10249 Berlin (DE). **STEIDL, Stefan** [DE/DE];

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

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

(48) Date of publication of this corrected version:

14 February 2008

(15) Information about Correction:

see Notice of 14 February 2008

(54) Title: HIGH AFFINITY HUMAN AND HUMANIZED ANTI- $\alpha 5 \beta 1$ INTEGRIN FUNCTION BLOCKING ANTIBODIES
WITH REDUCED IMMUNOGENICITY

(57) Abstract: The present invention relates to recombinant human or humanized polypeptides which bind to $\alpha 5 \beta 1$ integrin with
high affinity and blocking function. Further, diagnostic and pharmaceutical applications of the polypeptides are disclosed.

WO 2007/134876 A2

High affinity human and humanized anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin function blocking antibodies with reduced immunogenicity

- 5 The present invention relates to recombinant human or humanized polypeptides which bind to $\alpha 5\beta 1$ integrin with high affinity and blocking function. Further, diagnostic and pharmaceutical applications of the polypeptides are disclosed.
- 10 Angiogenesis is the process by which new blood vessels develop from pre-existing vessels. The growth of new blood vessels promotes embryonic development, wound healing, and the female reproductive cycle. It also plays an important role in the pathological development of solid cancers and other diseases e.g. haemangiomas, diabetic retinopathy, age-related macular
- 15 degeneration, psoriasis, rheumatoid arthritis and possibly osteoarthritis and inflammatory bowel disease (1).

- Growth factors released by hypoxic tumor tissue stimulate the growth of new blood vessels. While growth factors and their receptors play key roles in
- 20 angiogenic sprouting, adhesion to the extracellular matrix (ECM) also is a prime-regulator of angiogenesis. Adhesion promotes endothelial cell survival, as well as endothelial proliferation and migration (2-5). One ECM protein in particular, fibronectin, is expressed in provisional (tumor) matrices and provides proliferative signals to vascular cells (2,3). Notably, fibronectin-null
- 25 mice die early in development from a collection of defects, which include an improperly formed vasculature (6,7).

- Studies in experimental animal models and in mutant mice indicate that the $\alpha 5\beta 1$ integrin which is the most important receptor for fibronectin plays a key
- 30 role in regulating angiogenesis. Embryonic deletion of this integrin induces early and lethal mesenchymal abnormalities, which include defects in the organisation of the emerging vasculature (8,9) and defects in the ability of endothelial cells to form vessel-like structures in vitro (10,11).

14
The expression of the $\alpha 5 \beta 1$ integrin is specifically associated with angiogenesis: it is not detectable in quiescent endothelium but expressed in response to angiogenic growth factors (3,4) in vitro or within the angiogenic vasculature of a growing tumor in vivo (12, 20, 21).

Kim et al. (3) could demonstrate that the mouse anti- $\alpha 5 \beta 1$ integrin-function blocking antibody IIA1 inhibits both growth factor-induced and tumor angiogenesis in vivo. Studies of the signals transduced when this integrin is antagonised indicate that the unligated receptor activates PKA, which then activates caspase 3 and 8 and induces apoptosis (2,13).

Attempts have been carried out to prepare humanized derivatives of the mouse antibody IIA1 (BD Pharmingen Cat. No. 555614). As a result, a 82% human/18% mouse chimeric IgG4 monoclonal antibody termed M200, was generated. Further, a monovalent Fab-fragment of M200, termed F200, has been generated and successfully tested in a cynomolgus monkey model for macular degeneration. Further attempts to prepare fully humanized antibody derivatives of M200, however, resulted in a dramatic loss of bioactivity (14).

Any application of presently known antibodies against $\alpha 5 \beta 1$ integrin such as M200 or F200 in human medicine has the risk of inducing an immunogenic human anti-chimeric antibody (HACA) response in human patients. Thus, an object of the present invention was to provide human anti- $\alpha 5 \beta 1$ integrin antibodies which have reduced immunogenicity compared to existing chimeric antibodies while retaining target-specificity and high bioactivity and affinity.

According to the present invention, fully human antibodies in the Fab format were isolated from a HuCAL[®]-Gold antibody library by phage display using $\alpha 5 \beta 1$ integrin transfected cells. These antibodies show high *in vitro* activity while low immunogenicity can be expected in human patients due to the fully human origin.

Thus, a first aspect of the present invention is a human or humanized antibody or an antigen-binding fragment thereof which (i) binds to $\alpha 5\beta 1$ integrin with an affinity of 100 nM and preferably ≤ 10 nM and (ii) inhibits the adhesion of $\alpha 5\beta 1$ integrin expressing cells to its receptor *in vitro* and *in vivo*.

The polypeptide of the present invention is a human or humanized antibody or an antigen-binding fragment thereof. The term „human antibody“ according to the present invention relates to antibody molecules which have substantially human or fully human variable domains and, if present, human constant domains. The term „human“ as used in the present application relates to sequences which can be formed in individual human beings or by use of consensus sequences resulting therefrom, e.g. as described in the corresponding compendium by Kabat et al. (1991), Sequences of Proteins of immunological Interest, 5th Edition, NIH Publication no. 91-3242, US Department of Health and Human Services, Washington, DC, which is herein incorporated by reference. The term „substantially human“ refers to sequences which may differ from „fully human“ sequences as described by Kabat et al. in up to 1, 2, 3, 4 or 5 amino acids. More particularly, the antibodies or antibody fragments according to the present invention comprise substantially or fully human variable framework regions in the heavy (H) and light (L) immunoglobulin chains. The term „humanized antibody“ in the sense of the present invention relates to antibody molecules which have substantially murine or fully murine variable domains and human or substantially human constant domains, and which are $> 82\%$, preferably at least 90%, and especially preferably at least 98% human. The term „murine“ as used in the present application relates to sequences which can be formed in individual rodents or by use of consensus sequences resulting therefrom. The term „substantially murine“ refers to sequences which may differ from „fully murine“ sequences in up to 1, 2, 3, 4 or 5 amino acids. Preferably, the antibody or antibody fragment thereof is an IgG antibody, e.g. a human or humanized IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 antibody or a fragment thereof, e.g. a Fab, Fab' or (Fab)₂ fragment. The present invention, however,

also relates to recombinant antibodies having human sequences, e.g. single chain (sc) antibodies or fragment thereof, e.g. scFv fragments.

5 The antibodies or antibody fragments of the present invention contain one or more antigen-binding sites which specifically interact with $\alpha 5 \beta 1$ integrin. Preferably, this antigen-binding properties are obtained by combining a variable heavy chain (VH) and a variable light chain (VL) region. A VH or VL region includes framework regions (FR1, FR2, FR3, and FR4) and antigen binding-mediating CDR regions (H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3 for the VH
10 region and L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 for the VL region).

The human or humanized antibody or antibody fragment of the invention preferably has an affinity for the $\alpha 5 \beta 1$ integrin corresponding to a K_D value of ≤ 100 nM, preferably ≤ 10 nM and most preferably ≤ 1 nM, wherein the affinity
15 is determined by FACS-titration on $\alpha 5 \beta 1$ positive human HUVEC cells as described in the Examples or by competition BIAcore or competition ELISA measurement.

Further, the polypeptides of the invention inhibit the adhesion of an $\alpha 5 \beta 1$
20 integrin expressing human tumor cell as described in the Examples, for example the K562 cell (ATCC accession number: CCL-243) studied by Lozzio et al. (1979), Leukemia Research, 3: 363-370, *in vitro*. Preferably, the antibody or antibody fragment shows a 50% inhibition of cell adhesion at a concentration (IC50) of ≤ 10 nM and preferably ≤ 5 nM.

25 Further, the polypeptides of the invention preferably are capable of inducing caspase activity in HUVEC cells. The IC50 value with regard to HUVEC viability is preferably ≤ 10 nM, more preferably ≤ 5 nM, wherein the IC50 value (50% viability) is determined as described in the Examples.

30 Further, the polypeptides, antibodies and antibody fragments of the invention can preferably be used for diagnosis and for prevention and treatment of tumors and cancer, especially colon carcinoma.

Said polypeptides, antibodies and antibody fragments can be conjugated with detectable labelling groups, such as radioactive, NMR, dye, enzyme and fluorescent labelling groups. Radioactive groups can be, for example I^{125} , I^{131} or Y^{90} .

5

Preferably, the antibody or antibody fragment of the invention comprises:

- (a) a VH region selected from
 - (i) amino acid sequence SEQ ID NO: 1 (MOR04624), SEQ ID NO: 3 (MOR04055) or at least one H-CDR1, H-CDR2 and/or H-CDR3 region of one of said VH regions, or
 - (ii) an amino acid sequence derived from a sequence of (i) by alteration of at least one H-CDR region, and/or
- (b) a VL region selected from
 - (i) amino acid sequence SEQ ID NO: 2 (MOR04624), SEQ ID NO: 4 (MOR04055) or at least one L-CDR1, L-CDR2 and/or L-CDR3 region of one of said VL regions, or
 - (ii) an amino acid sequence derived from a sequence of (i) by alteration of at least one L-CDR region.

20

Especially preferred is an antibody or antibody fragment comprising a VH region derived from a VH-region of (a) (i) as described above by randomization of the H-CDR2 region.

25

In another especially preferred embodiment the antibody or antibody fragment comprises a VL-region derived from a VL-region of (b) (i) as described above by randomization of the L-CDR3 region.

30

In still another especially preferred embodiment the antibody or antibody fragment comprises a VH- and/or a VL-region derived from a VH-region of (a) (i) and/or a VL-region of (b) (i) by shuffling of the antibody chains.

Sublibraries of H-CDR2 and L-CDR3 are generated by exchange of H-CDR2 and L-CDR3, respectively, with human CDR repertoires by methods of protein engineering (17).

5 For example the antibody or antibody fragment comprises a VH and/or VL region derived from the VL and/or VH region as described in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2 (MOR04624). Especially preferred is a polypeptide comprising:

- 10 (a) a VH-region selected from amino acid sequence SEQ ID NO: 5 (MOR04971), SEQ ID NO: 7 (MOR04974), SEQ ID NO: 9 (MOR04975), SEQ ID NO: 11 (MOR04977), and SEQ ID NO: 11 (MOR04985) or at least one H-CDR1, H-CDR2 and/or H-CDR3 region of said VH-regions, and/or
- 15 (b) a VL-region selected from amino acid sequence SEQ ID NO: 6 (MOR04971), SEQ ID NO: 8 (MOR04974), SEQ ID NO: 10 (MOR04975), SEQ ID NO: 12 (MOR04977) and SEQ ID NO: 14 (MOR04985), or at least one L-CDR1, L-CDR2 and/or L-CDR3 region of said VL-region.

20 Specific examples of polypeptides of the present invention are as follows:

An antibody or antibody fragment comprising the VH region of SEQ ID NO: 1 and the VL region of SEQ ID NO: 2 (MOR04624) or at least one H-CDR1-, H-CDR-2, H-CDR3-, L-CDR1-, L-CDR2- or L-CDR3-region thereof.

25

An antibody or antibody fragment comprising the VH region of SEQ ID NO: 3 and the VL region of SEQ ID NO: 4 (MOR04055) or at least one H-CDR1-, H-CDR-2, H-CDR3-, L-CDR1-, L-CDR2- or L-CDR3-region thereof.

30 An antibody or antibody fragment comprising the VH region of SEQ ID NO: 5 and the VL region of SEQ ID NO: 6 (MOR04971) or at least one H-CDR1-, H-CDR-2, H-CDR3-, L-CDR1-, L-CDR2- or L-CDR3-region thereof.

An antibody or antibody fragment comprising the VH region of SEQ ID NO: 7 and the VL region of SEQ ID NO: 8 (MOR04974) or at least one H-CDR1-, H-CDR-2, H-CDR3-, L-CDR1-, L-CDR2- or L-CDR3-region thereof.

- 5 An antibody or antibody fragment comprising the VH region of SEQ ID NO: 9 and the VL region of SEQ ID NO: 10 (MOR04975) or at least one H-CDR1-, H-CDR-2, H-CDR3-, L-CDR1-, L-CDR2- or L-CDR3-region thereof.

- 10 An antibody or antibody fragment comprising the VH region of SEQ ID NO: 11 and the VL region of SEQ ID NO: 12 (MOR04977) or at least one H-CDR1-, H-CDR-2, H-CDR3-, L-CDR1-, L-CDR2- or L-CDR3-region thereof.

- 15 An antibody or antibody fragment comprising the VH region of SEQ ID NO: 13 and the VL region of SEQ ID NO: 14 (MOR04985) or at least one H-CDR1-, H-CDR-2, H-CDR3-, L-CDR1-, L-CDR2- or L-CDR3-region thereof.

- 20 The invention also refers to antibodies or antibody fragments which are directed against the same epitope on the antigen as the above-mentioned preferred and/or exemplified antibodies or antibody fragments.

The VH and VL chain of the polypeptide comprises the following regions:

- VH chain of MOR04624, MOR04055 and derivatives (numbering scheme according to (17)):

- 25
- Framework 1 region extends from amino acid 1 to 30aa
 - CDR1 region extends from amino acid 31 to 35 aa
 - Framework 2 region extends from amino acid 36 to 49aa
 - CDR2 region extends from amino acid 50 to 65aa
 - 30 - Framework 3 region extends from amino acid 66 to 94aa
 - CDR3 region extends from amino acid 95 to 102aa
 - Framework 4 region extends from amino acid 103 to 113aa

VLk1 chain of MOR04624 and derivatives (numbering scheme according to (17)):

- Framework 1 region extends from amino acid 1 to 23aa
- 5 CDR1 region extends from amino acid 24 to 35aa
- Framework 2 region extends from amino acid 36 to 50aa
- CDR2 region extends from amino acid 51 to 57aa
- Framework 3 region extends from amino acid 59 to 89aa
- CDR3 region extends from amino acid 90 to 98aa
- 10 Framework4 region extends from amino acid 99 to 109aa

VLk1 chain of MOR04055 and derivatives (numbering scheme according to (17)):

- 15 Framework 1 region extends from amino acid 1 to 23aa
- CDR1 region extends from amino acid 24 to 35aa
- Framework 2 region extends from amino acid 36 to 50aa
- CDR2 region extends from amino acid 51 to 57aa
- Framework 3 region extends from amino acid 58 to 89aa
- 20 CDR3 region extends from amino acid 90 to 98aa
- Framework 4 region extends from amino acid 99 to 109aa

- The framework regions of the VH- and/or VL-chain may be altered by exchange of one or more amino acids, e.g. 1, 2, 3, 4 or 5 amino acids. For
- 25 example, the framework 3 region of the VLk1 chain may be altered in members of the MOR04624 family. Preferably, the amino acid at position 85 of the Fab sequence is exchangeable, with an exchange of valine (MOR04624, MOR04985) to threonine (MOR04974, -75, -77) being especially preferred. Further, the framework 1 region of the VH chain may be
- 30 altered. In a preferred embodiment, the amino acid at position 3 of each VH- Fab sequence may be exchanged. Especially preferred is an exchange of glutamine (q) to glutamic acid (e) which may, for example, occur during cloning.

The polypeptide of the invention is suitable for therapeutic or diagnostic applications, e.g. for *in vitro* or *in vivo* diagnostic applications.

- 5 For therapeutic applications, the antibody or antibody fragment may be used as such. Alternatively, the polypeptide may be in the form of a conjugate with a therapeutic agent, for example selected from radiotherapeutical agents or chemotherapeutical agents, e.g. low molecular weight or biologic cytostatic or cytotoxic agents. The therapeutic agent may be conjugated to the
- 10 antibody or antibody fragment according to known methods, preferably via a covalent linkage to reactive amino, carboxy, hydroxy and/or sulphhydryl groups of the polypeptide, optionally using homo- or hetero-bifunctional linkers.
- 15 In a further embodiment, the polypeptide may be in the form of a fusion protein comprising an antibody or antibody fragment domain and a heterologous fusion domain, e.g. a cytokine such as IL-2, IL-12 or TNF- α . Other therapeutically relevant fusion partners of the antibodies or antibody fragments according to the invention comprise engineered IgG Fc-parts for
- 20 increased or decreased immunoeffector cell recruitment, protein toxins such as RNAses or ETA, small drug molecules such as maytansine or auristatin derivatives, enzymes for prodrug activation, fusion proteins with other integrin function blocking antagonists, or fusion proteins with enzymes having antiangiogenic activity such as MMP-2 or MMP-9 (15). Further, the
- 25 fusion protein may be in the form of a bispecific antibody which comprises at least one $\alpha 5 \beta 1$ integrin binding domain as described above and a binding domain specific for a further antigen. For example, the second antigen binding domain may be directed against chelating agents for diagnostic and/or therapeutic radionucleotides, e.g. alpha, beta or gamma emitting
- 30 radionuclides such as ^{90}Y , diagnostic NIR(near-infrared) dyes, therapeutically active dyes, surface molecules on immunological effector cells, e.g. NK-cells, cytotoxic T-cells or NK T-cells, functional blocking anti-VEGF binding domains and function blocking binding domains against VEGF receptor 1, 2

and 3 and cytokines such as interleukins.

For diagnostic applications, the polypeptide may be in the form of a conjugate with a detectable labelling group, e.g. a labelling group for an *in vitro* or *in vivo* diagnostic application. For example, the detectable labelling group may be selected from radioactive, NMR, dye, enzyme and fluorescent (e.g. NIR fluorescent) labelling groups.

For therapeutic applications, the polypeptide is preferably formulated into a pharmaceutical composition which may additionally comprise further active ingredients and/or pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants. The pharmaceutical composition comprises the active agent in a therapeutically active dose, which may be determined by a skilled person according to standard methods, e.g. by *in vitro* experiments or in animal models. The composition is preferably administered by infusion, injection or inhalation. The dose of the active ingredient is determined according to the type and the severity of the disorder and the constitution of the patient to be treated. Preferably, the therapeutic composition is administered in several doses over a time of at least 2-4 weeks. In this context, it is referred to known protocols for the administration of antibodies or antibody conjugates, e.g. as described in Ferrara et al. Nature Reviews Drug Discovery, Vol. 3, May 2004, 391-400 and Salgaller, Current Opinion in Molecular Therapeutics, 2003, 5(6), 657-667 or to protocols for administering pharmaceutical antibodies like Rituximab, Campath, Remicade etc.

Further, the invention relates to a diagnostic composition comprising an antibody or antibody fragment as described above as a diagnostic reagent. The diagnostic composition may comprise further diagnostically acceptable reagents, carriers, diluents and/or adjuvants. The diagnostic composition comprises the polypeptide in an amount sufficient to allow diagnostic detection in the respective assay format, e.g. in an *in vivo* or *in vitro* diagnostic assay format.

28

The composition may be used for therapeutic or diagnostic applications in $\alpha 5 \beta 1$ integrin associated disorders. For example, these disorders may be hyperproliferative disorders, e.g. disorders associated with angiogenesis and/or metastasis, particularly cancer. Cancers which may be treated by the composition according to the invention particularly comprise all kinds of solid tumors, e.g. cancers of the colon, kidney, lung, prostate, breast, brain, stomach, liver or skin. Alternatively, the compositions may be employed in the treatment of hematological cancers associated with angiogenesis. Other disorders associated with neovascularization comprise, but are not limited to, endometriosis, hemangioma, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, arteriosclerotic plaques, inflammatory bowel disease, inflammatory CNS disease, Psoriasis, eye disorders such as diabetic retinopathy or age-related macular disease, and hypertrophic scars. In a preferred embodiment the antiangiogenic activity of the composition is independent of growth factors.

The composition may comprise one or several antibodies or antibody fragments, e.g. a combination of antibodies or antibody fragments binding to different domains of $\alpha 5 \beta 1$ integrin. The composition may also contain small molecule drugs for combination therapy. The composition is suitable for application in human and veterinary medicine. Especially preferred is an application in human medicine.

Further, the present invention relates to a nucleic acid encoding an antibody or antibody fragment or fusion polypeptide as described above. The nucleic acid may be e.g. a single stranded or double stranded DNA or RNA. Preferably, the nucleic acid is operatively linked to an expression control sequence, which allows expression in a suitable host cell or host organism. The nucleic acid may be present on a vector or a vector system, (i.e. a plurality of vectors) which may be introduced into a host cell or host organism. The vector may be a prokaryotic vector suitable for prokaryotic cells, e.g. a plasmid or bacteriophage. Further, the vector may be an eukaryotic vector for eukaryotic host cells or host organisms, e.g. a plasmid, an artificial chromosome or a viral vector. Suitable vectors are described e.g.

in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press and Ausubel et al. (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons.

- 5 The present invention also refers to a cell, e.g. a prokaryotic cell or an eukaryotic cell such as a human cell which is transformed with a nucleic acid or a vector as described above. Furthermore, the invention relates to a non-human organism, e.g. a transgenic animal, such as a transgenic non-human mammal, which is transformed with a nucleic acid or vector as described
10 above. The term „transformation“ includes all methods for introducing foreign nucleic acids into a cell or an organism including transfection or infection.

- The polypeptide may be prepared by cultivating a cell or a non-human organism as described above under conditions under which the polypeptide
15 are expressed and the expressed polypeptide is recovered, e.g. from the cell, culture medium, organism or excretion products of the organism.

Further, the present invention shall be explained in detail in the following Figures and Examples:

20

Figure 1A: FACS Analysis of K562 cells for $\alpha 5$ expression: The expression of the human $\alpha 5\beta 1$ integrin on the cell surface of living K562-cells was demonstrated with the function-blocking anti $\alpha 5\beta 1$ integrin mouse monoclonal antibody IIA1 (14). For this purpose, standard FACS-procedures
25 were used as described in the HuCAL[®] GOLD Manual provided by MorphoSys.

Figure 1B: The human colon carcinoma cell line HT29 does not express the $\alpha 5$ -Integrin chain.

- 30 FACS analysis demonstrated that HT29 cells do not express the $\alpha 5$ -integrin chain, whereas the $\beta 1$ chain is present on the cell surface at a high density. For this reason, HT29 cells are excellently suited for the transfection with the $\alpha 5$ -integrin chain.

Figure 1C: The human colon carcinoma cell line HT29 expresses the $\alpha 5 \beta 1$ Integrin after transfection with the $\alpha 5$ -Integrin cDNA.

transfection with the $\alpha 5$ -integrin chain, the homogenous expression of the
5 $\alpha 5 \beta 1$ integrin on the surface of the HT29 $\alpha 5$ cells was demonstrated by FACS
analysis using the function-blocking mouse anti human $\alpha 5 \beta 1$ -integrin
monoclonal antibody IIA1 as the reference.

Figure 2: Inhibition of the adhesion of K562 cells to fibronectin-coated

10 **culture plates** K562-cells preloaded with Calcein were incubated in the
presence of function-blocking (IIA1) or non-blocking (VC5) anti $\alpha 5 \beta 1$ integrin
mouse monoclonal antibodies. Integrin-independent background binding of
K562-cells to fibronectin was determined using 10 mM EDTA. The overall
background of the assay was determined on BSA-blocked wells which do not
15 support the adhesion of K562 cells to the surface of culture plates. Adherent
cells (after washing) were lysed and fluorescence was determined.

**Figure 3: Fab-mediated dose-dependent inhibition of K562 cells to
fibronectin**

20 Anti human $\alpha 5 \beta 1$ -specific Fab were tested for their ability to inhibit the
binding of fluorescent dye-loaded K562-cells to immobilized fibronectin. After
adhesion, cells were lysed and fluorescence was determined as a measure
for adherent cells. Fibronectin alone indicates the maximum adhesion
whereas the overall background of the assay was determined on BSA-
25 coated cells.

**Figure 4: Anti $\alpha 5 \beta 1$ -function blocking antibodies induce apoptosis in
endothelial cells.**

The induction of caspase 3/7 activation of the purified Fab in the monovalent
30 format was determined using HUVEC cells in serum free endothelial cell
medium. Caspase activity was determined using a commercially available
chemoluminescent assay system (Caspase Glo, PROMEGA) according to
the manufacturers' instructions.

Figure 5: Competition FACS of Fab and IIA1

The FACS-competition indicates that MOR04624 competes with the epitope of the reference antibody IIA1 on HT29 α 5 cells. It can be concluded that both
5 antibodies share the similar epitope, whereas all other Fab react with unrelated binding sites on the α 5 β 1 integrin. (black line – Fab binding, green line – Fab binding when competed with reference antibody IIA1).

**Figure 6: Affinity-matured anti α 5 β 1-function blocking antibodies
10 potentially induce apoptosis in endothelial cells**

The induction of caspase 3/7 activation of the purified Fab in the monovalent format was determined using HUVEC cells in serum free endothelial cell medium. Caspase activity was determined using a commercially available chemoluminescent assay system (Caspase Glo, PROMEGA) according to
15 the manufacturers' instructions.

**Figure 7: Affinity-matured anti α 5 β 1-function blocking Fab antibodies
inhibit the proliferation of endothelial cells**

Adherent HUVEC cells in serum free endothelial cell medium were incubated
20 for 48 hours in presence of the indicated amount of purified Fab or reference antibody IIA1. Proliferating cells were determined with a commercially available XTT-assay according to the manufacturers' instructions. The IC50-values were determined and summarized in Table 4.

Figure 8: Optimized IgGs in HUVEC adhesion assay

Inhibition of adhesion of HUVEC cells to fibronectin by α 5 β 1 function blocking IgG antibodies. IgG MOR04974, MOR04975, MOR04977, MOR04985 block adhesion with a similar IC50 than IIA1. Conversion from Fab to IgG resulted in an approximately 2-fold improvement.
30

Figure 9: HUVEC viability assay – analysis of anti- α 5 β 1 integrin IgGs

Inhibition of viability of HUVEC cells by α 5 β 1 function blocking IgG antibodies. HUVEC cells were plated on fibronectin coated plates, incubated

with increasing concentration of IgG antibodies and survival measured after 48 h. IgG MOR04974, MOR04975, MOR04977, MOR04985 block adhesion with a similar IC₅₀ than IIA1. Conversion from Fab to IgG resulted in an approximately 2-fold improvement.

5

Figure 10: HUVEC Caspase assay of anti- $\alpha 5\beta 1$ Integrin IgGs

The induction of Caspase 3/7 activation by the $\alpha 5\beta 1$ function blocking IgG antibodies was determined using HUVEC cells in serum free endothelial cell medium. Caspase activity was determined using a commercially available
10 chemoluminescent assay system (Caspase glo, PROMEGA) according to the manufacturers' instructions. MOR04974, MOR04975, MOR04977 and MOR04985 are similar active as the reference antibody IIA1.

Figure 11: Affinity-matured Fab specifically precipitate the $\alpha 5\beta 1$ integrin from surface biotinylated cell lysates

15 Surface-biotinylated NP40-lysates of HT29 $\alpha 5$ and HT29wt were incubated with Fab coupled to magnetic Dyna beads. The immunoprecipitates were transferred to PVDF-membranes and analysed with streptavidin alkaline phosphatase (AP). All Fab specifically precipitated a protein of the expected
20 size comparable to the reference antibody IIA1 out of the HT29 $\alpha 5$ lysate whereas no protein was detectable in the HT29wt lysate. The irrelevant Fab MOR03207 did not specifically precipitate any protein.

Figure 12: Binding specificity of the anti- $\alpha 5\beta 1$ Integrin IgG (example MOR04974) to HT29-wt and HT29 $\alpha 5$ (FACS measurement)

25 Affinity matured IgG antibodies were incubated at 10 $\mu\text{g/mL}$ with 5×10^5 HT29wt and HT29 $\alpha 5$ cells. Specifically bound antibodies were detected with a Cy3-labelled secondary antibody. Upper panel: IIA1 incubated with HT29wt (left) or HT29 $\alpha 5$ -cells (right), lower panel: IgG1 MOR04974. The
30 fluorescence shift indicates specific binding to $\alpha 5$ integrin and was found for MOR04975, MOR04977, MOR04985 and MOR04624. Antibody isotype controls are negative (black lines). Our anti-integrin antibodies bind to $\alpha 5$ -

chain transfected cells with the same specificity as the reference antibody IIA1.

Figure 13: Competition binding of the anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin IgG (example MOR04974) on HT29 $\alpha 5$ cells with IIA1 (FACS measurement). The anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin IgG competes with IIA1 for an overlapping epitope.

In-house produced anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies were incubated at 1 μ g/mL with 5×10^5 HT29 $\alpha 5$ cells which were either preincubated with 20 μ g/mL IIA1 or not. Presence of IIA1 binding is demonstrated by detection with goat-anti-mouse-FITC (left panel). Binding and competition of the human antibody (MOR04974) is shown by detection with the goat-anti-human-FITC secondary antibody (right panel). This example shows the competition for MOR04974. Same result was found for MOR04975, MOR04977, MOR04985, MOR04624.

Figure 14: Analysis of the IgG1 anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies in the tube formation assay (Example MOR04974). Affinity optimized anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin IgG1 antibodies block tube formation as efficiently as IIA1.

Early passage human endothelial vein umbilical cells (HUVECs #2519) were harvested at 60-80% confluency and 2×10^4 cells were inoculated on Matrigel (Becton Dickinson #354234) containing wells in EBM-2 medium (Clonetics #CC3156). Antibodies were added 15 min later and tube formation was allowed to proceed for 18 – 24h at 37°C. Then cells were fixed (4% formalin), permeabilized, blocked and stained with anti-CD31. Antibodies were applied at 6nM, 3nM, 600pM, 300pM, and 60pM. Representative images are shown for the effect at 300pM A: non-treated sample, B: human IgG1 anti-lysozyme MOR03207, C: IgG1 MOR04624, D: IgG1 MOR04974, E: IIA1, F: murine IgG1. The same result was also found for MOR04975 and MOR04977

Figure 15: Activity of the affinity optimized anti- $\alpha 5 \beta 1$ integrin IgG antibodies in the transwell migration assay.

The migration assay is performed in a 96-well transwell migration microplate (8 μ m pores, #351163 Falcon/BD), with fibronectin as the only stimulus. The underside of fluoroblok membrane was coated with 2 μ g/mL of fibronectin for 1h at 37°C and blocked with 2% BSA for 30 min at 37°C. Human endothelial serum-free medium (Invitrogen) containing 0,1% BSA was used as migration buffer in the upper and lower chamber. Anti- $\alpha 5 \beta 1$ integrin antibodies (0,6 – 10 μ g/mL) were added to the upper chamber of each well, early passage HUVEC (2×10^4) were added and migration of cells was allowed to proceed for 4h at 37°C. Migrated cells on the underside of the membranes were then calcein- stained and the resulting fluorescence was determined with a Perkin Elmer1220 Victor counter at 485nm excitation and 535nm emission.

A: Shown images were obtained at 10 μ g/mL antibody concentration. MOR04974, MOR04975, MOR04977 inhibited the migration of HUVEC as efficient as IIA1.

B: Dose-response of anti-migratory activity of MOR04974, - 75, -77 (IgG4-Pro antibody isotype). IC50s (MOR04974:1 μ g/ml, MOR04975: 1,5 μ g/ml, MOR04977: 1 μ g/ml, IIA1: 2 μ g/ml)

20

Figure 16: IHC staining pattern of affinity-optimized IgG1 anti- $\alpha 5 \beta 1$ -integrin antibodies on colon carcinoma tissue.

Magnification 10x, Biotinylated antibodies were titrated on serial tissue sections of colon carcinoma. Detection was done with streptavidin-alkaline phosphatase. As an example the immunohistochemical sections obtained with a concentration of 2,5 μ g/mL is shown. For IIA1 and MOR04974, staining of small to intermediate size vessels and stromal compartment was found. Black arrows show the same vessels stained by both antibodies. A similar staining pattern was found for MOR04975 and MOR04977. Blue arrows indicate stained vessels. It can be concluded that the optimized anti- $\alpha 5 \beta 1$ integrin antibodies show staining patterns comparable to IIA1.

Figure 17: Tumor Targeting of the affinity optimized anti- $\alpha 5\beta 1$ Integrin antibodies (IgG4-Pro).

Anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies were radiolabeled with Iodine-125 (1min,
5 Iodogen method). Remaining immunoreactivity was determined to be 75-
80% and 3 μ g labelled antibody were injected into HT29 $\alpha 5$ xenografted nude
mice.

A: Tumor uptake of IgG1 MOR04974, MOR04975 and controls (reference
antibody IIA1 and anti-lysozyme MOR03207), B: Tumor uptake of IgG1
10 MOR04977 and controls.

Antibody uptake of the anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies was as similar as for IIA1
and significantly higher compared to the irrelevant IgG1 MOR03207. We
conclude from this result that the anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies specifically
15 target the $\alpha 5\beta 1$ integrin-positive HT29 $\alpha 5$ xenografts.

Figure 18: Analysis of the optimized anti- $\alpha 5\beta 1$ Integrin IgG antibodies in the 3D in vivo spheroid surrogate model of angiogenesis.

Matrigel plugs containing spheroids of defined endothelial cell number
20 together with VEGF and FGF2 were implanted subcutaneously into SCID
mice. EC-Sprouting and vessel formation of a complex network with the
mouse vasculature was analyzed after treatment with the optimized human
anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies and control antibodies. The human IgG
MOR04974 and MOR04975 were as efficacious as IIA1.

The invention is further illustrated in the Examples. The following Examples are, however, not to be understood as a limitation.

Examples

5 1. Generation of function blocking anti- $\alpha 5\beta 1$ Integrin Antibodies

1.1 Screening strategies

The mouse monoclonal antibody IIA1 binds to a conformational epitope of $\alpha 5\beta 1$ integrin which is only present on activated living (endothelial) cells. To
10 cover both selectivity and functional activity, a screening path composed of alternate pannings on isolated antigen and antigen-expressing cells in combination with functional cell-based screening assays was established for the identification of HuCAL[®] GOLD derived lead antibody candidates in the Fab format:

15

1. Selection of anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin binding Fab antibody fragments by phage display using the HuCAL[®]-Gold Library (MorphoSys). Panning experiments were performed on isolated antigen and antigen-expressing cells. Based on the amino acid sequences of the best antibody clones sublibraries were
20 generated by randomization of either the VL-CDR3 or the VH-CDR2 using human CDR sequences and from which in further panning experiments even advanced binders were selected. Additional clones were obtained by cloning combinations of light and heavy chains containing interesting VL-CDR3 and VH-CDR2 in one antibody molecule ("X-cloning").

25

2. Screening of enriched Fab-antibodies was done as the following. Binders of all pannings were tested for ELISA-binding on $\alpha 5\beta 1$ integrin-positive and $\alpha 3\beta 1$ integrin-negative cells. ELISA positive clones were then further analysed for cell binding in FACS experiments on $\alpha 5$ -overexpressing cells
30 and $\alpha 5$ -negative cells. Suitable clones were then analysed in functional assays for i) cell adhesion to fibronectin ii) induction of apoptosis of HUVEC

(human umbilical vein endothelial cells) and/or HDMVEC (human dermal vascular endothelial cells) iii) Affinity measurement and FACS competition assay with reference antibody IIA1 and iv) species crossreactivity.

5

1.2 Tool generation and assay development

$\alpha 5$ -Integrin chain cDNA

The cDNA for the human $\alpha 5$ -chain was purchased from RZPD (IMAGE-ID
10 6821577) and cloned into the pcDNA3-expression vector (INVITROGEN)
according to standard methods.

Purified integrin receptors

Detergent-solubilized human integrin receptors $\alpha 5\beta 1$ (Chemicon CC1052)
15 and $\alpha 3\beta 1$ (Chemicon CC1092) were purchased from CHEMICON
INTERNATIONAL (Temecula, CA, USA). For solid phase phage display,
ELISA and BiaCore-assays, integrin-batches with a purity of at least 90%
were selected by non-denaturing SDS-PAGE.

20 Cell lines

The adhesion of the human chronic myelogenous leukemia cell line K562
(ATCC accession number: CCL-243) to fibronectin is solely mediated by the
 $\alpha 5\beta 1$ integrin (16). This cell line was used in the fibronectin-mediated
adhesion assay for initial functional screening. The presence of the $\alpha 5\beta 1$ -
25 integrin was demonstrated by FACS-analysis using antibody IIA1 for
detection (Fig. 1A).

A prerequisite for differential cell panning strategies is a model system,
where the target of interest is overexpressed on a target-negative cell line.

30 For this purpose, we have chosen the human colon carcinoma cell line HT29
(ATCC accession number: HTB-38) which expresses the $\beta 1$ -integrin chain,
but not the $\alpha 5$ -chain (Fig. 1B). The cDNA of the $\alpha 5$ -chain was transfected
into the parental HT29-cells using Lipofectamine according to the

manufacturer's instruction. A stable $\alpha 5$ -overexpressing clone was selected by FACS-screening using the mouse monoclonal antibody IIA1 for the specific labeling of surface expressed $\alpha 5\beta 1$ integrin (Fig. 1C).

5 **Adhesion assay**

- A sensitive adhesion assay for functional screening was established using the K562 cell line which only expresses the human $\alpha 5\beta 1$ integrin. For this purpose, 96 well plates were coated with 1 μ g/ml human fibronectin or BSA as a non-adhesive substrate to determine the overall background of the
- 10 assay. Since the adhesion of integrins to ECM molecules is dependent on the presence $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, 10mM EDTA was used to determine the integrin-independent background binding on fibronectin. The function-blocking antibody IIA1 was used as a reference and a non-blocking anti $\alpha 5\beta 1$ integrin mouse monoclonal antibody (VC5) served as the negative antibody-control.
- 15 As expected, both EDTA, IIA1 (5 μ g/ml) and BSA-coating inhibited the binding of K562-mediated adhesion, whereas VC5 (5 μ g/ml) did not interfere in cell adhesion (Fig. 2).

1.3 Antibody phage display and panning strategies

- 20 Antibody phage display for the identification of fully human anti $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies was performed with a HuCAL[®]-GOLD library according to the protocols described in literature (17-20). The following panning strategies were applied and run in parallel (Table 1):

Panning subcode	1 st round	2 nd round	3 rd round
1298.1-3	$\alpha 5\beta 1$ integrin solid phase	$\alpha 5\beta 1$ integrin solid phase	$\alpha 5\beta 1$ integrin solid phase
1298.4-6	$\alpha 5\beta 1$ integrin solid phase	K562 cells	$\alpha 5\beta 1$ integrin solid phase
1299.1-3	K562 cells	$\alpha 5\beta 1$ integrin solid phase	K562 cells
1321.1-3	$\alpha 5\beta 1$ integrin solid phase	HT29 $\alpha 5$ cells	$\alpha 5\beta 1$ integrin solid phase
1322.1-3	HT29 $\alpha 5$ cells p.a. HT29wt	$\alpha 5\beta 1$ integrin solid phase	HT29 $\alpha 5$ cells
1322.4-6	HT29 $\alpha 5$ cells p.a. HT29wt	HT29 $\alpha 5$ cells p.a. HT29wt	HT29 $\alpha 5$ cells
1324.1-3	HDMVEC	$\alpha 5\beta 1$ integrin solid phase	HDMVEC
1369.1-2	$\alpha 5\beta 1$ integrin solid phase	HT29 $\alpha 5$ cells p.a. HT29wt	$\alpha 5\beta 1$ integrin solid phase
1371.1-2	HT29 $\alpha 5$ cells p.a. HT29wt	$\alpha 5\beta 1$ integrin solid phase	HT29 $\alpha 5$ cells p.a. HT29wt

Table 1: Overview panning approaches

p.a: post adsorption with HT29wt (to reduce non-specific cell surface binding)

5

Results:

During the pannings 1298-1324, several thousand clones were screened.

Despite the fact that various display-strategies were applied, one clone (MOR04055) which was selective in ELISA and FACS was repeatedly

10

isolated. Besides MOR04055 which apparently binds to an immunodominant epitope, 4 additional clones were identified (MOR04139, 04141, 04160, 04568). To further increase the chance of selecting more diverse and specific integrin binders, 2 additional pannings (1369.1-2 and 1371.1-2) were performed. Here, 10 μ g/ml MOR04055-Fab was added during phage display

in order to suppress the enrichment of the dominating clone MOR04055. Despite of Fab-competition, all specific binders found throughout pannings 1369 were again MOR04055. In pannings 1371, one additional individual binder (MOR04624) was identified.

5

1.4 Functional testing Fab-antibodies

Adhesion assay

10

Antibodies obtained from the first panning approach were ranked according to their function-blocking potency in a pre-screening experiment as follows: MOR04624>MOR04055>MOR04141=MOR04568=MOR04160. MOR04139 was slightly inhibitory but did not reach 50% inhibition. The dose dependent re-testing of the antibodies at different concentrations in the K562 adhesion assay confirmed the result of our pre-screening experiment with one exception: MOR04139 did not show any dose-dependent inhibition. This antibody was not further investigated (Fig.3).

15

Induction of apoptosis

20

Antibodies obtained from the first panning approach were further assessed for the apoptosis-inducing properties. Therefore 96 well plates were coated with 0.2 and 0.4 µg/ml of fibronectin for 1 hour at 37°C and blocked with 2% BSA. 1×10^4 HUVEC cells were incubated together with the respective antibody in serum free medium for endothelial cell culture (Gibco). After 18 hours, a caspase3/7 assay kit was used for cell lysis and quantification of caspase activity according to the procedure described by the manufacturer (Caspase Glo 3/7; Promega). At a concentration of 100 µg/ml the monovalent Fab MOR04055 and 04624 induced caspase 3/7 activity in HUVEC cells as strongly as the bivalent reference IgG IIA1 at 10 µg/ml (Fig. 4). All other Fab were negative in this assay.

25

30

Affinity measurements by FACS titration

To analyse binding potency on native $\alpha 5\beta 1$ -integrin all antibodies were tested on $\alpha 5\beta 1$ -positive HUVEC cells by FACS titration (Table 2).

- MOR04055 had the highest binding affinity (0.9 nM) and showed an increase in the dimeric IgG format. For MOR04624 a KD in the low nanomolar range for the monovalent Fab, and an increase in KD for the dimeric IgG was found.

MOR	KD (nM) Monovalent Fab	KD IgG
04055	0.9	0.5
04139	No rel. Fit	n.d.
04624	7.5	3.1
IgG IIA1	-	0.6/1.0

Table 2: Result of affinity determination of monovalent Fabs and IgGs by FACS titration

Competition FACS of Fab and IIA1

- To investigate whether the Fab antibodies share the same epitope with IIA1 or not, HT29 $\alpha 5$ cells were incubated either with 0.5 μ g/ml Fab alone or together with 10 μ g/ml IIA1. Human Fabs binding to the cells were detected with goat anti human Fab-specific-PE conjugate for FACS analyses. Fig. 7 shows an overlay of Fab staining only (black lines) and Fab + IIA1 (green lines). As a result, the addition of IIA1 lead to a clear decrease in staining intensity by MOR04624. All other Fabs were not affected by IIA1. This result indicates that IIA1 and MOR04624 compete with each other for the binding to an identical or overlapping epitope, while the other 4 Fabs bind to unrelated epitopes.

1.5 Affinity-maturation: Analysis of Fab and IgG antibodies

The Fabs MOR04055 and 04624 were subjected to one round of affinity maturation. Therefore sublibraries were constructed from the parental Fab by either randomization of VL-CDR3 or VH-CDR2 (17) and subjected to phage display selections on purified $\alpha 5\beta 1$ and HT29 $\alpha 5$ cells. Positive binders of this screening were further analyzed in adhesion assay on HT29 $\alpha 5$ cells and ranked according to their inhibitory activity. Best inhibitory potential was found for derivatives of MOR04624. Derivatives of MOR04055, MOR04568, MOR04141 did show only moderate or no significant improvement in inhibition. Based on the light and heavy chains of these clones 12 new combinations of VL-CDR3 and VH-CDR2 were cloned for further optimization (so called "X-cloning"). Best inhibitory clones and clones from X-cloning were expressed and purified and compared in vitro so that eventually 7 consolidated unique binders with improved function blocking activities were identified for further in-depth analysis (MOR04971, -72, -74, -75, -77, -85, -87).

Induction of apoptosis

Apoptosis-induction on HUVEC cells in vitro was measured by caspase activity and cell survival (Fig. 6 and Fig. 7). In both assays the efficacy of the monovalent Fab MOR04974, 04975 and 04977 were comparable to the bivalent mouse monoclonal reference antibody IIA1.

5

10

15

	IC ₅₀ (μg/ml)	IC ₅₀ (nM)
IIA1	0.05	0.3
MOR04624	11.25	225.0
MOR04985	0.09	1.8
MOR04987	0.12	2.4
MOR04977	0.09	1.9
MOR04975	0.09	1.8
MOR04974	0.06	1.2
MOR04055	1.87	37.3
MOR04971	0.21	4.3
MOR04972	0.67	13.3

Table 3: IC50 values of Fab antibodies in the XTT-proliferation assay

In comparison to the parental Fab, the affinity matured antibodies were significantly improved (up to a factor of 190). The inhibition of proliferation of the monovalent Fab was 4-fold less efficacious than the bivalent reference antibody IIA1.

Immunoprecipitation

To demonstrate the specificity of the Fab antibodies, NP-40 lysates of surface-biotinylated HT29α5 and HT29wt cells were incubated with Fab coupled to magnetic Dyna-beads. IIA1 was used as a reference antibody. After intensive washing the precipitates were boiled in SDS-PAGE sample buffer under reducing conditions, blotted to PVDF-membranes and probed with streptavidine-AP. All anti-α5β1 integrin antibodies specifically precipitated a protein double kband of ~135 kDa which corresponds to the expected molecular weight of the integrin chains α5 and β1 (Fig. 11) and was not found in the HT29wt cell lysate. The same double band was found with IIA1. The irrelevant Fab MOR03207 was used as a negative control and did not precipitate this double band. This result demonstrates the high specificity of the Fab antibodies.

Optimized IgGs in HUVEC adhesion assay

To investigate whether the in vitro potency of the above described Fab
5 antibodies is further improved in the dimeric format the antibodies were
converted into full IgG1 molecules according to standard technologies using
the MorphoSys HuCAL IgG Vector Kit (MorphoSys AG, Munich; Germany)
and were analyzed by HUVEC adhesion assay (Fig. 8), HUVEC viability
assay (Fig. 9) and HUVEC apoptosis assay (Fig. 10) in comparison to the
10 reference antibody IIA1.

Most importantly, IIA1 was included in every experiment as reference point.
In this respect IgG conversion of MOR04974, -75 and -77 resulted in HuCAL
IgGs with a very similar IC_{50} to IIA1, indicating that conversion indeed did
15 lead to an ~2fold improvement compared to the monovalent Fab format.

Optimized IgGs in HUVEC viability assay

It was observed that after IgG conversion five binders had ~2fold improved
20 IC_{50} values compared to the Fab format. MOR04974, -75, and -77 showed a
very similar efficacy in reducing HUVEC viability as reference IgG IIA1.

Optimized IgGs in HUVEC apoptosis assay

25 From analysis of lead IgGs in the Caspase3,7 assay it could be concluded
that MOR04974, -75 and -77 induced apoptosis comparably well as the
reference antibody IIA1.

1.6 In depth-analysis of affinity optimized anti-integrin IgG antibodies

Specificity of the affinity optimized anti-Integrin antibodies

- 5 Affinity matured antibodies of the IgG1-format were tested for their binding specificity by FACS analysis on HT29wt vs. HT29 α 5 cells. HT29wt cells are α 5-negative but do contain the β 1-integrin chain. HT29 α 5 but not the HT29wt cells are specifically recognized by the IgG1-anti-integrin antibodies and the reference antibody IIA1 as indicated by the fluorescence shift. (figure 12).
- 10 An unspecific antibody isotype control does not bind to the cells and no shift in measured fluorescence was observed. These experiments show that the lead candidate antibodies specifically recognize the α 5 integrin and bind with the same specificity as the reference antibody IIA1.

15 Epitope specificity of anti- α 5 β 1-integrin antibodies is retained after affinity maturation and recloning into the IgG format

- We have shown by FACS competition experiments that the Fab antibody MOR04624 and its derivatives compete with the reference antibody IIA1 for the binding to an overlapping epitope. After conversion to the IgG1 format,
- 20 the anti- α 5 β 1 integrin antibodies were tested again for binding competition with the IIA1. Binding of the IgG1 anti- α 5 β 1 integrin antibodies MOR04974, -75, -77, -85 and MOR04624 to HT29 α 5 cells resulted in a shift of fluorescence which was completely inhibited when cells were preincubated
- 25 with IIA1. This result confirmed the epitope competition of IIA1 and the IgG1 anti- α 5 β 1 integrin antibodies (Fig 13).

30 Qualitative Analysis of the anti- α 5 β 1 Integrin IgG1 antibodies in the tube formation angiogenesis assay.

- Blockade of newly formed vessels from activated endothelial cells is considered to be one of the key inhibitory activities of the anti- α 5 β 1 integrin antibodies. For full characterization we analyzed the affinity-optimized IgG1
- 35 anti- α 5 β 1 Integrin antibodies in comparison with the reference antibody IIA1

in a HUVEC tube formation assay.

- In this assay, 2×10^4 human endothelial vein umbilical cells (HUVECs #2519, Promocell) were seeded on growth factor rich Matrigel (Becton Dickinson #354234) in EBM-2 medium (Clonetics #CC3156). Antibodies (6nM, 3nM, 600pM, 300pM, 60pM) were added 15 min later and tube formation was allowed for 18 – 24 h at 37°C. Cells were then fixed and stained with anti-CD31 for photo documentation of the tube formation.
- 10 Visual analysis of the complex networks formed in the wells revealed tube formation blocking activity for all MOR04624-derived anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies with similar potency as the reference antibody (Fig 14). At high concentrations, antibody blockade of tube formation was also found for the human and murine IgG1 isotype controls. At lower antibody concentrations
- 15 (down to 300pM) , however, an activity window was observed where tube formation was only blocked in wells treated with specific antibody but not in untreated wells or wells treated with the antibody isotype control or the weak function-blocking antibody MOR04624.
- 20 **Analysis of the anti- $\alpha 5\beta 1$ Integrin IgG antibodies In the Migration assay**
- During the angiogenic process, activated endothelial cells migrate towards an angiogenic stimulus on an angiogenesis-specific provisional matrix consisting mainly of fibronectin (FN). We analyzed the optimized anti- $\alpha 5\beta 1$
- 25 integrin IgG antibodies in the transwell migration assay and found blocking activity of $\alpha 5\beta 1$ -fibronectin dependent HUVEC migration for all anti- $\alpha 5\beta 1$ antibodies with an efficacy in the same order of magnitude (1-10 μ g/ml) as IIA1 (Fig. 15).

Reactivity of anti- $\alpha 5 \beta 1$ integrin antibodies**Reactivity on tumor and endothelial cell lines**

Reactivity of the anti- $\alpha 5 \beta 1$ integrin antibodies was tested on various
5 endothelial and tumor cell lines by FACS binding experiments (table 4).
Binding to all tested endothelial and tumor cell lines except for HT29wt cells,
which are known to be $\alpha 5$ -chain negative, were observed. In comparison to
the reference antibody IIA1, the lead candidate antibodies bound equally well
to all tested cell lines and the resulting shift in fluorescence was similar for all
10 antibodies. Isotype control antibodies did not bind. In summary, the anti-
 $\alpha 5 \beta 1$ integrin antibodies show reactivity equivalent to IIA1 in FACS cell
binding experiments.

Cell line	Tissue	anti- α V β 3	anti- α V β 5	anti- α 5 β 1*						
				VC5	IIA1	MOR04974	MOR04975	MOR04977	MOR04985	MOR04624
HDMVEC	human dermal microvascular endothelial cells	+	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
HMEC	Human mammary epithel				+++	+++				
HPAEC	human pulmonary artery endothelium				+++	+++				
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells	++	+	+++	+++	+++				
MS-1	Mouse pancreas endothelium				-	-				
PAEC	pig aortic endothelial cells	-	+	+++	-	-				
hTumorend	Human tumor endothelium				++	+++	+++	+++	+++	+++
A375	malignant melanoma				+	++	++	++	+/-	+
A549	Human lung carcinoma				++	+++	+++	+++	+++	++
Colo205	Human adenocarcinoma	-	-	++	++	++	++	++	++	++
DU145	Human prostate carcinoma				+++	+++	+++	+++	+++	+++
HCT 116	colorectal carcinoma				+	++	++	++	+/-	+
HT-1080	Fibrosarcoma				++	+++	+++	+++	+	+++
MCF-7	Human breast carcinoma	+/-	++	+	+	+	+	+	+	+
MDA-MB-231	Human mammary carcinoma	++	++	+++	++/+++	++	++	++	+	++
PC-3	human prostata adenocarcinoma	+	+	++	++					
U251	Human glioblastoma	+	+	++	++	++	++	++	++	++
HT29	Human adenocarcinoma	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-
HT29 α 5	HT29 transf. with α 5 chain				+++	+++	+++	+++	+++	+++

Table 4: FACS reactivity of anti- α 5 β 1 integrin antibodies on various cell lines. +=weak shift, ++ strong shift (1 log fluorescence), +++ very strong shift (2 log Fluorescence); *mIgG1 and hulgG1 as antibody controls were used as standard controls and binding was negative; Antibody material: anti-human CD51/61 chemicon #CBL 544, anti- α v β 5 chemicon #Mab 20192, non function-blocking α 5 β 1 integrin antibody VC5 Pharmingen #555650, anti- α 5 β 1 integrin antibody IIA1 Pharmingen #55561

Reactivity of anti- $\alpha 5\beta 1$ antibodies on normal and tumor tissue sections - Immunohistochemistry

5 The affinity-optimized anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies were analyzed in immunohistochemistry experiments on different tissue section and the specific reactivity profile of the anti-integrin antibodies on the respective tissues very much resembled the staining of IIA1. In summary, we conclude that the our anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies show staining patterns comparable to IIA1 (Fig 16).

10

In vivo characterization of the affinity optimized anti- $\alpha 5\beta 1$ Integrin IgG antibodies

Demonstration of in vivo targeting in xenografted nude mice

15 The in vivo targeting properties of the optimized anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies in comparison to IIA1 were compared in nude mice carrying xenografts of HT29 $\alpha 5$ cells.

20 Radiolabeling of the optimized anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies (IgG4-Pro) was performed with iodine-125 according to the iodogen-method for 1 min according to standard procedures. Immunoreactivity was measured in a cell-binding assay ("Lindmo assay"). 50ng of radiolabeled antibody were incubated with increasing numbers (0,25 to 10 Mio) of $\alpha 5\beta 1$ integrin-positive cells for 2h at 4°C. Then cells were washed and bound radioactivity was determined in a scintillation counter.

25 The quotient of total counts /bound counts was plotted against 1/cell number and data were fitted with a non-linear regression model. From the intersection with the y-axis the remaining immunoreactivity at infinite antigen density was calculated and found to be 75-80% for all anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies.

30

The human anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies accumulated within from 24hours to the HT29 $\alpha 5$ xenografts with >10%ID/g lasting 96hours for all analyzed antibodies

except MOR04975 which rapidly decreased after 48 hours to less than 5% ID/g after 72h. MOR04974 reached its peak value after 48 hours with 18% ID/g and MOR04977 after 72h with 18% ID/g. In comparison the murine IIA1 antibody accumulated within from 24h at the HT29 α 5 xenografts with >10%ID/g lasting for up to 96h. For the non-specific anti-lysozyme antibody MOR03207 less than 3%ID/g were found at any time point. From these results a specific targeting of α 5 β 1-positive HT29 α 5 xenografts can be concluded. The *in vivo* targeting of the anti- α 5 β 1 integrin antibodies MOR04974 and MOR04977 is similar to IIA1 and at single time points even superior.

In vivo efficacy of anti- α 5 β 1 integrin antibodies from surrogate animal models of angiogenesis

As the reference antibody IIA1, the anti- α 5 β 1 integrin antibodies are not cross-reactive with mouse and rat α 5 β 1 integrin. Therefore analysis of the *in vivo* therapeutic efficacy and demonstration of the specific *in vivo* antiangiogenic effect in animal models is difficult and has to be performed in surrogate models of angiogenesis.

In vivo comparison of the anti- α 5 β 1 integrin IgG antibodies with IIA1 has been performed in the 3D *in vivo* spheroid surrogate model of angiogenesis (Fig 18).

For this model spheroids of defined endothelial cell number were mixed with collagen which was allowed to polymerize in a 24 well plate. EC spheroids in matrigel plugs containing VEGF and FGF2 were then implanted subcutaneously into SCID mice where the stimulated ECs formed a complex three dimensional network of human capillaries that anastomosed with the mouse vasculature. Anti- α 5 β 1 integrin antibodies (200 μ g) were given twice weekly for three weeks. At day 21 the study was terminated, matrigel plugs were removed and examined for blood vessel density. As for the reference antibody IIA1 treatment with the optimized anti- α 5 β 1 integrin IgG antibodies MOR04974 and MOR04975 reduced the microvessel density in the matrigel plugs by a factor of two to approximately 20 microvessels per mm² while treatment with the irrelevant human anti-lysozyme antibody MOR03277 resulted in about 40 microvessels per mm².

Based on this result it can be concluded that the optimized human anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibodies MOR04974 and MOR04975 have comparable in vivo anti-angiogenic efficacy as IIA1 in the 3D in vivo spheroid surrogate model of angiogenesis.

5

Conclusion:

In in vitro experiments the best inhibitory properties in Fab as well as IgG1 format were consistently found for MOR4974, -75, -77. All three IgGs are comparable to reference mAb IIA1. These binders are derivatives of MOR04624. In in vivo experiments the fully human and optimized IgG MOR04974, -75, -77 were demonstrated to target efficiently tumor xenografts in nude mice and in the 3D spheroid model of angiogenesis MOR04974 and MOR04975 were as efficacious as the reference antibody IIA1.

10

The amino acid sequences of the V chains of the above antibodies are shown in Table 4:

Parental MOR04624

5

Final hlgG1 kappa	VH-h-IgG1-vector	VL-h-kappa-vector
MOR04974	MOR04985	MOR04990
MOR04975	MOR04985	MOR04991
10 MOR04977	MOR04987	MOR04989
MOR04985	MOR04985	MOR04624

MOR04624

15

VLk (SEQ ID NO: 1)

diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapklliyaasnlqsgpsrfsqsgsgtdftltisslq
pedfavyyccqysdqsytfgggkveikrt

VH (SEQ ID NO: 2)

20 qvqlvesggglvqpggsrlscaasgftfsnyamnwvrqapgkglewvssisysdsntyyadsvkgrftisrdns
kntlylqmnsraedtavyycargldyghhhglsqgifdywgqglvtvss

MOR04055

25

VLλ3 (SEQ ID NO: 3)

dieltqppsvsvapggqtariscsgdsigeqyahwyqqkpgqapvlviyddnkrpsgiperfsgsngntatltis
gtqaedeadyyccsytlntasvfgggtklvlg

30 VH3 (SEQ ID NO: 4)

qvqlvesggglvqpggsrlscaasgftfsnyamnwvrqapgkglewvrisysgsdtyyadsvkgrftisrdns
kntlylqmnsraedtavyycaregefgyfmystlvfdswgqglvtvss

MOR04971

35

VLλ3 (SEQ ID NO: 5)

dieltqppsvsvapggqtariscsgdsigeqyahwyqqkpgqapvlviyddnkrpsgiperfsgsngntatltis
gtqaedeadyyccsytyssdasvfgggtklvlg

40 VH3 (SEQ ID NO: 6)

qvqlvesggglvqpggsrlscaasgftfsnyamnwvrqapgkglewvsaihdnghtyypdsvkgrftisrdns
kntlylqmnsraedtavyycaregefgyfmystlvfdswgqglvtvss

MOR04974

VLk (SEQ ID NO: 7)
5 diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapkliyaasnlqsgpsrfsqsgsgtdftltisslq
pedfatyycqqyasprqtfqggtkveikrt

VH (SEQ ID NO: 8)
qvqlvesggglvqpggsrlscaasgftfssygmswvrqapgkglewvsgirakqsgyatdyaapvkgrftisrd
nskntlylqmnsraedtavyycargldyghhhglsigfdywgqgtlvtvss

MOR04975

10 VLk (SEQ ID NO: 9)
diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapkliyaasnlqsgpsrfsqsgsgtdftltisslq
pedfatyycqqyefgiqtfqggtkveikrt

VH (SEQ ID NO: 10)
15 qvqlvesggglvqpggsrlscaasgftfssygmswvrqapgkglewvsgirakqsgyatdyaapvkgrftisrd
nskntlylqmnsraedtavyycargldyghhhglsigfdywgqgtlvtvss

MOR04977

20 VLk (SEQ ID NO: 11)
diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapkliyaasnlqsgpsrfsqsgsgtdftltisslq
pedfatyycqqysnpqtfqggtkveikrt

VH (SEQ ID NO: 12)
25 qvqlvesggglvqpggsrlscaasgftfssygmswvrqapgkglewvsfiepkwrggathyaasvkgrftisrd
nskntlylqmnsraedtavyycargldyghhhglsigfdywgqgtlvtvss

MOR04985

30 VLk (SEQ ID NO: 13)
diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapkliyaasnlqsgpsrfsqsgsgtdftltisslq
pedfavyycqqysdqsytfqggtkveikrt

VH (SEQ ID NO: 14)
35 qvqlvesggglvqpggsrlscaasgftfssygmswvrqapgkglewvsgirakqsgyatdyaapvkgrftisrd
nskntlylqmnsraedtavyycargldyghhhglsigfdywgqgtlvtvss

54

2. Conclusion:

Anti- $\alpha 5 \beta 1$ integrin function blocking antibodies have only been available in a chimeric antibody format. Approaches for a fully humanization have failed.

- 5 Application of such antibodies in the clinical setting may induce an immune response in human patients. Especially for a chronically applied anti-angiogenic compound this may lead to increased dosing or even severe side effect which may lead to the early termination of treatment.
- 10 We have identified fully human $\alpha 5 \beta 1$ integrin function blocking antibodies with an excellent biological profile. It is advantageous to existing murine and chimeric antibodies due to its fully human nature which will guarantee lack of side effects in clinical settings as far as possible. It is expected that the probability of inducing an immune response against this molecule with severe side effects and
- 15 or increased doses is much lower. Therefore these molecules are much more suitable for the application in human medicine, e.g. for the treatment of solid tumors.

References:

- 1) Carmeliet P and Jain RK (2000) Nature 407: 249-257
- 2) Kim S et al. (2002) J Clin Invest 110: 933-941
- 5 3) Kim S et al. (2002) Am J Pathol 156: 1345-1362
- 4) Kim S et al. (2002) J Biol Chem 275: 33920-33928
- 5) Cheresh DA and Stupack DG (2002) Nat Med 8: 193-194
- 6) George EL et al. (1993) Development 119: 1079-1091
- 7) George EL et al. (1997) Blood 90: 3073-3081
- 10 8) Yang et al. (1993) Development 119: 1093-1105
- 9) Goh KL et al. (1997) Development 124: 4309-4319
- 10) Taverna D and Hynes RO (2001) Cancer Res 61: 5255-5261
- 11) Francis SE et al. (2002) Arterioscler Thromb Vasc Biol 22: 927-933
- 12) McDonald D and Choyke PL (2003) Nat Med 9: 713-725
- 15 13) Bakre MM et al. (2002) Nat Med 8: 995-1003
- 14) Finck B (2004) SRI conference „Angiogenesis: New Opportunities And Solutions For Drug Development“, Cambridge, MA
- 15) Symington BE (1989) J Biol Chem 264: 13258-13266
- 16) Knappik A et al. (2000) J Mol Biol 296: 57-86
- 20 17) Krebs B et al. (2001) J Immunol Methods 254: 67-84
- 18) Rauchenberger R et al. (2003) J Biol Chem 278: 38194-38205
- 19) Lohning C, United States Patent 6,753,136
- 20) Magnussen et al. (2005) Cancer Research 65: 2712-2721
- 21) Yao et al. (2006) Cancer Research 66: 2639-2649.

Claims

1. A human or humanized antibody or an antigen-binding fragment thereof
5 which binds to $\alpha 5\beta 1$ integrin with an affinity of ≤ 100 nM and which inhibits the adhesion of $\alpha 5\beta 1$ integrin-expressing cells to its receptor *in vitro* and *in vivo*.
2. The antibody or fragment of claim 1 which binds to $\alpha 5\beta 1$ integrin with an
10 affinity of ≤ 10 nM.
3. The antibody or antibody fragment of claim 1 or 2 which inhibits the adhesion of the K562 cell line *in vitro*.
- 15 4. The antibody or antibody fragment of any one of claims 1 to 3 which comprises:
 - (a) a VH-region selected from
 - (i) amino acid sequence SEQ ID NO: 1 (MOR04624), SEQ ID
20 NO: 3 (MOR04055) or at least one H-CDR1, H-CDR2 and/or H-CDR3 region of one of said VH regions, or
 - (ii) an amino acid sequence derived from a sequence of (i) by alteration of at least one H-CDR region, and/or
 - (b) a VL-region selected from
 - (i) amino acid sequence SEQ ID NO: 2 (MOR04624), SEQ ID
25 NO: 4 (MOR04055) or at least one L-CDR1, L-CDR2 and/or L-CDR3 region of one of said VL regions, or
 - (ii) an amino acid sequence derived from a sequence of (i) by alteration of at least one L-CDR region.
- 30 5. The antibody or antibody fragment of claim 4, comprising a VH-region derived from a VH-region of (a) (i) by randomization of the H-CDR2 region.
6. The antibody or antibody fragment of claim 4 or 5 comprising a VL-region derived from a VL-region of (b) (i) by randomization of the L-CDR3 region.

7. The antibody or antibody fragment of any one of claims 4 to 6 comprising a VH- and/or VL-region derived from a VH-region of (a) (i) and/or from a VL-region of (b) (i) by shuffling of the antibody chains.
- 5
8. The antibody or antibody fragment of any of claims 4 to 7 comprising
- (a) a VH-region selected from amino acid sequence SEQ ID NO: 5 (MOR04971), SEQ ID NO: 7 (MOR04974), SEQ ID NO: 9 (MOR04975), SEQ ID NO: 11 (MOR04977), and SEQ ID NO: 11 (MOR04985) or at least one H-CDR1, H-CDR2 and/or H-CDR3 region of said VH-regions, and/or
- 10
- (b) a VL-region selected from amino acid sequence SEQ ID NO: 6 (MOR04971), SEQ ID NO: 8 (MOR04974), SEQ ID NO: 10 (MOR04975), SEQ ID NO: 12 (MOR04977) and SEQ ID NO: 14 (MOR04985), or at least one L-CDR1, L-CDR2 and/or L-CDR3 region of said VL-regions.
- 15
9. An antibody or antibody fragment comprising the VH region of SEQ ID NO: 1 and the VL region of SEQ ID NO: 2 (MOR04624) or at least one H-CDR1-, H-CDR-2, H-CDR3-, L-CDR1-, L-CDR2- or L-CDR3-region thereof.
- 20
10. An antibody or antibody fragment comprising the VH region of SEQ ID NO: 3 and the VL region of SEQ ID NO: 4 (MOR04055) or at least one H-CDR1-, H-CDR-2, H-CDR3-, L-CDR1-, L-CDR2- or L-CDR3-region thereof.
- 25
11. An antibody or antibody fragment comprising the VH region of SEQ ID NO: 5 and the VL region of SEQ ID NO: 6 (MOR04971) or at least one H-CDR1-, H-CDR-2, H-CDR3-, L-CDR1-, L-CDR2- or L-CDR3-region thereof.
- 30
12. An antibody or antibody fragment comprising the VH region of SEQ ID NO: 7 and the VL region of SEQ ID NO: 8 (MOR04974) or at least one H-CDR1-, H-CDR-2, H-CDR3-, L-CDR1-, L-CDR2- or L-CDR3-region thereof.

13. An antibody or antibody fragment comprising the VH region of SEQ ID NO: 9 and the VL region of SEQ ID NO: 10 (MOR04975) or at least one H-CDR1-, H-CDR-2, H-CDR3-, L-CDR1-, L-CDR2- or L-CDR3-region thereof.
- 5 14. An antibody or antibody fragment comprising the VH region of SEQ ID NO: 11 and the VL region of SEQ ID NO: 12 (MOR04977) or at least one H-CDR1-, H-CDR-2, H-CDR3-, L-CDR1-, L-CDR2- or L-CDR3-region thereof.
- 10 15. An antibody or antibody fragment comprising the VH region of SEQ ID NO: 13 and the VL region of SEQ ID NO: 14 (MOR04985) or at least one H-CDR1-, H-CDR-2, H-CDR3-, L-CDR1-, L-CDR2- or L-CDR3-region thereof.
- 15 16. The antibody or antibody fragment of any one of claims 1 to 15 which is an IgG antibody, e.g. a human or humanized IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 antibody or a fragment thereof, e.g. a Fab, Fab' or F(ab)₂ fragment.
- 20 17. The antibody or antibody fragment of any one of claims 1 to 15 which is a recombinant antibody, e.g. a single-chain (sc) antibody, or a fragment thereof, e.g. a sc Fv fragment.
- 25 18. The antibody or antibody fragment of any one of claims 1-17 in the form of a conjugate with a therapeutic agent.
- 30 19. The antibody or antibody fragment of claim 18 wherein the therapeutic agent is selected from radiotherapeutical agents and chemotherapeutical agents.
20. The antibody or antibody fragment of claim 19 wherein the radiotherapeutical agent is I¹²⁵, I¹³¹ or Y⁹⁰.
21. The antibody or antibody fragment of any one of claims 1-17 in the form of a fusion polypeptide.

22. The antibody or antibody fragment of claim 21 as a fusion polypeptide with a cytokine or as a bispecific antibody.
- 5 23. The antibody or antibody fragment of any one of claims 1-17 in the form of a conjugate with a detectable labelling group.
- 10 24. The antibody or antibody fragment of claim 23, wherein the detectable labelling group is selected from radioactive, NMR, dye, enzyme and fluorescent labelling groups.
25. The antibody or antibody fragment of claim 24, wherein the detectable radioactive labelling group is selected from I^{125} , I^{131} or Y^{90} .
- 15 26. A pharmaceutical composition comprising as an active agent an antibody or antibody fragment of any one of claims 1 to 25.
27. The composition of claim 26 for the prevention or treatment of hyperproliferative disorders.
- 20 28. The composition of claim 26 or 27 for the prevention or treatment of cancer.
29. The composition of claim 26 or 27 for the prevention or treatment of colon carcinoma.
- 25 30. The composition of claim 26 or 27 for the prevention or treatment of tumors.
- 30 31. A diagnostic composition comprising as a diagnostic reagent an antibody or antibody fragment of any one of claims 1-17 or 23-24.
32. The composition of claim 32 for the diagnosis of hyperproliferative disorders or a predisposition therefor.

33. The composition of claim 32 for the diagnosis of cancer or a predisposition therefor.
- 5 34. The composition of any one of claims 26 to 33 for use in human medicine.
35. A nucleic acid encoding an antibody or antibody fragment of any one of claims 1 to 17 or 21 to 22.
- 10 36. The nucleic acid of claim 35 which is operatively linked to an expression control sequence.
37. A vector or vector system which comprises a nucleic acid of claim 35 or 37.
- 15 38. A cell which is transformed with a nucleic acid of claim 35 or 36 or with a vector of claim 37.
39. A non-human organism which is transformed with a nucleic acid of claim 35 or 36 or with a vector of claim 37.
- 20 40. A method for preparing a polypeptide of any one of claims 1-17 or 21-22, wherein a cell of claim 38 or a non-human organism of claim 39 is cultivated under conditions, under which the polypeptide is expressed and the expressed polypeptide recovered.
- 25 41. Use of a polypeptide of any one of claims 1 to 25 for the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of $\alpha 5\beta 1$ integrin associated disorders or a predisposition therefor.
- 30 42. The use of claim 41 or the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of cancer.
43. Use of a polypeptide of any one of claims 1 to 25 for the manufacture of a

44

reagent for the diagnosis of $\alpha 5 \beta 1$ integrin associated disorders or a predisposition therefor.

- 5 44. The use of claim 43 for the manufacture of a reagent for the diagnosis of cancer.

Figure 1A:

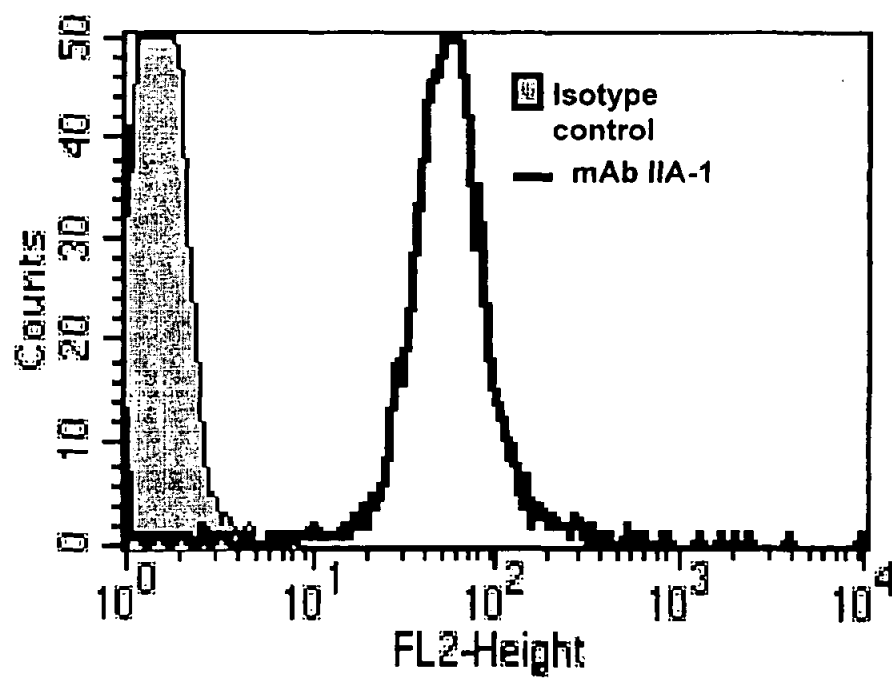


Figure 1B:

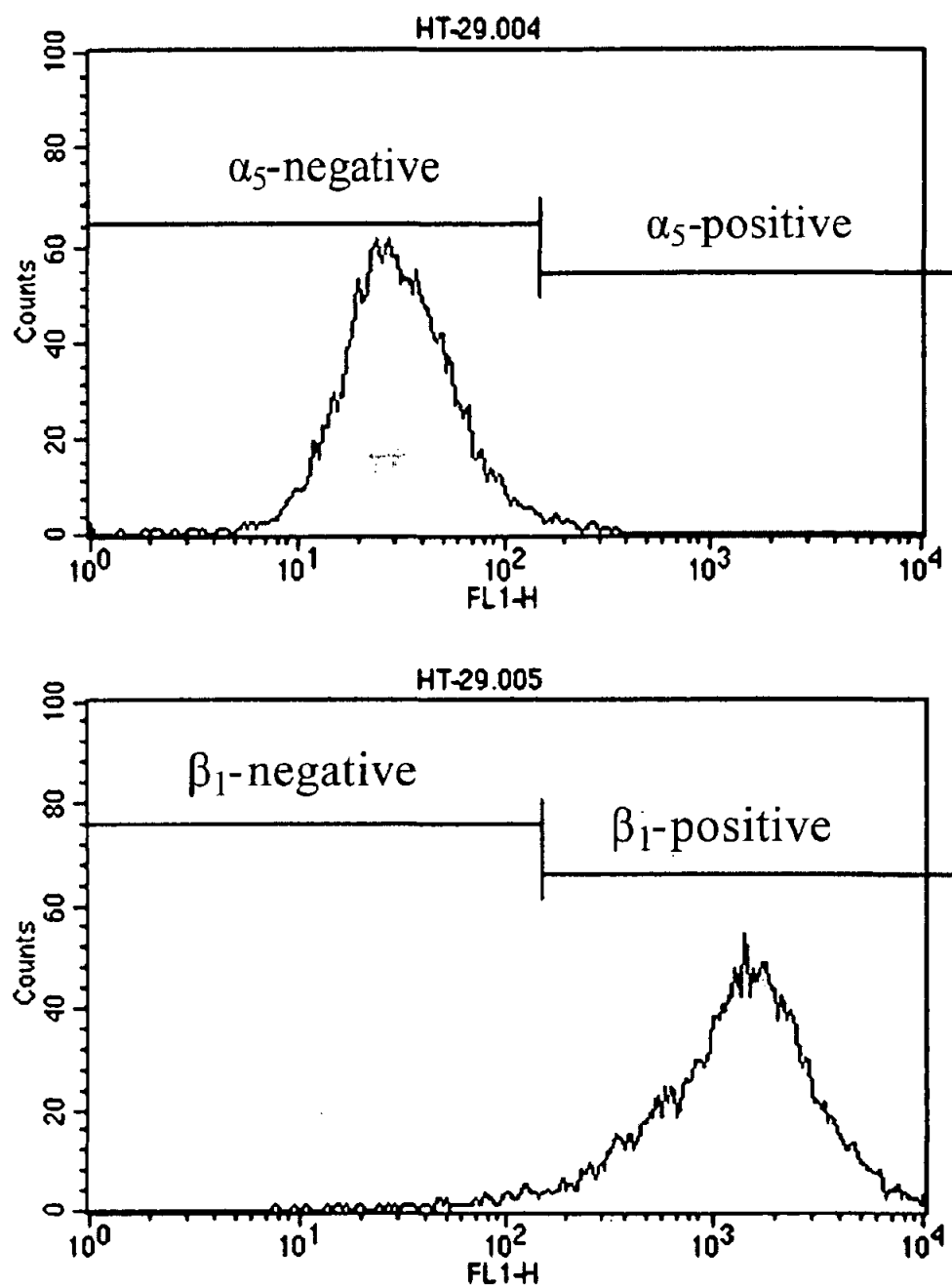
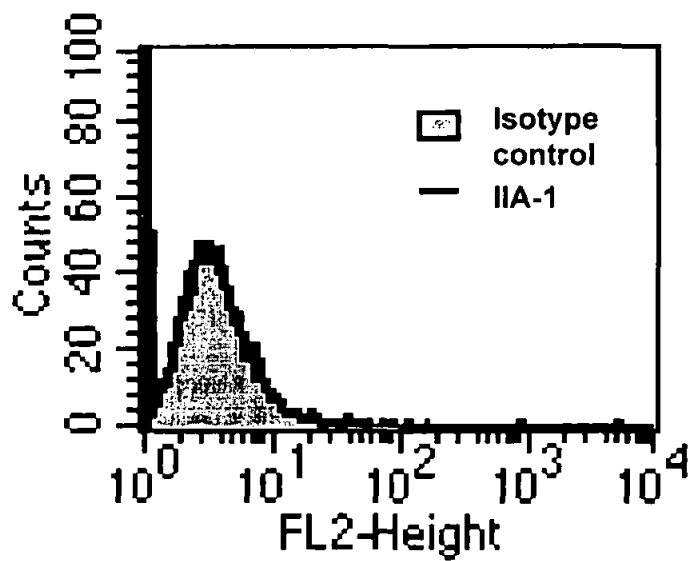


Figure 1C:

HT29 wild type



HT29 transfected

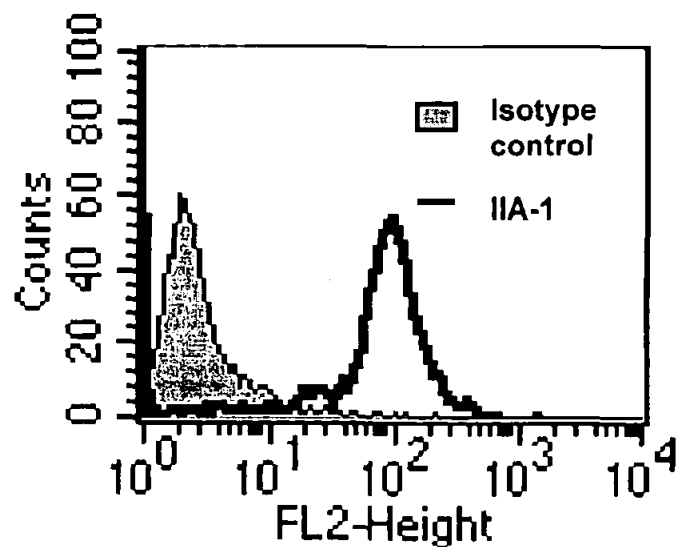


Figure 2:

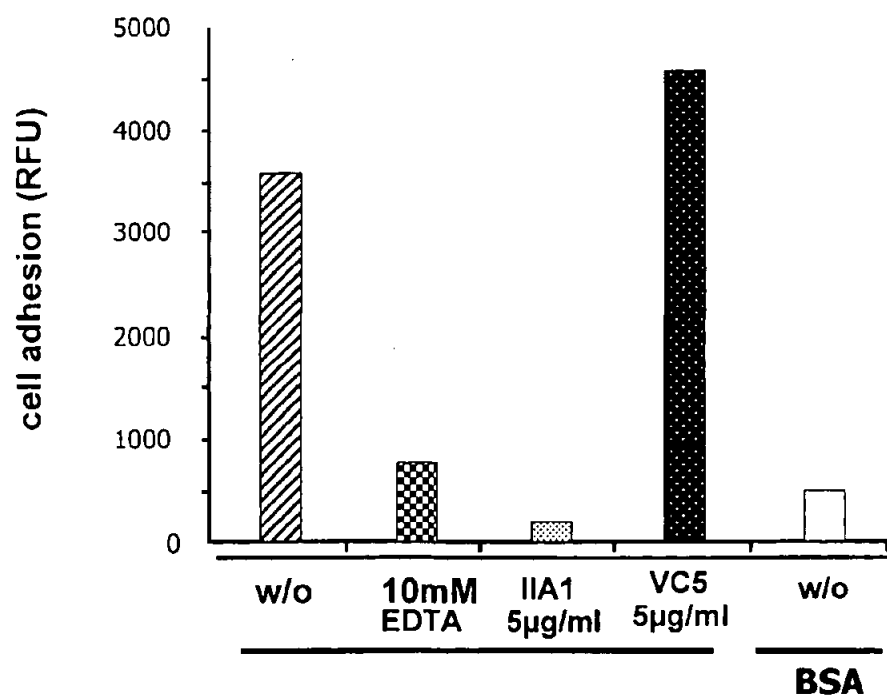


Figure 3:

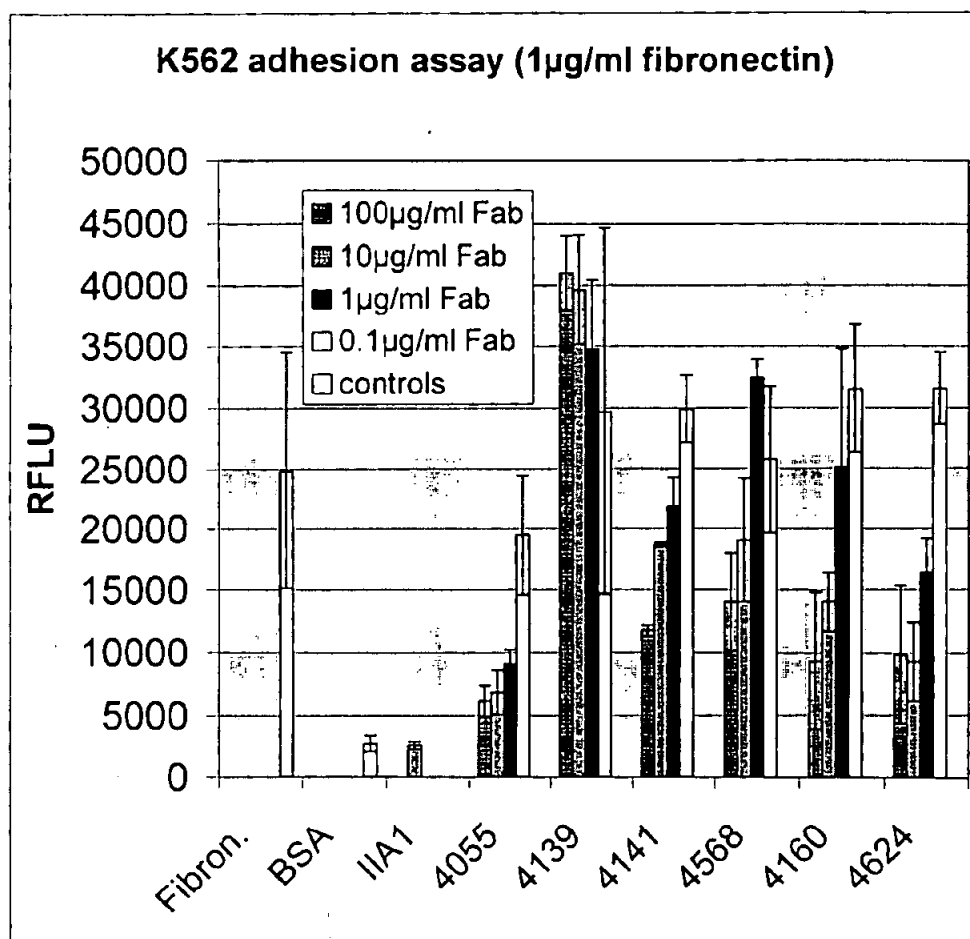
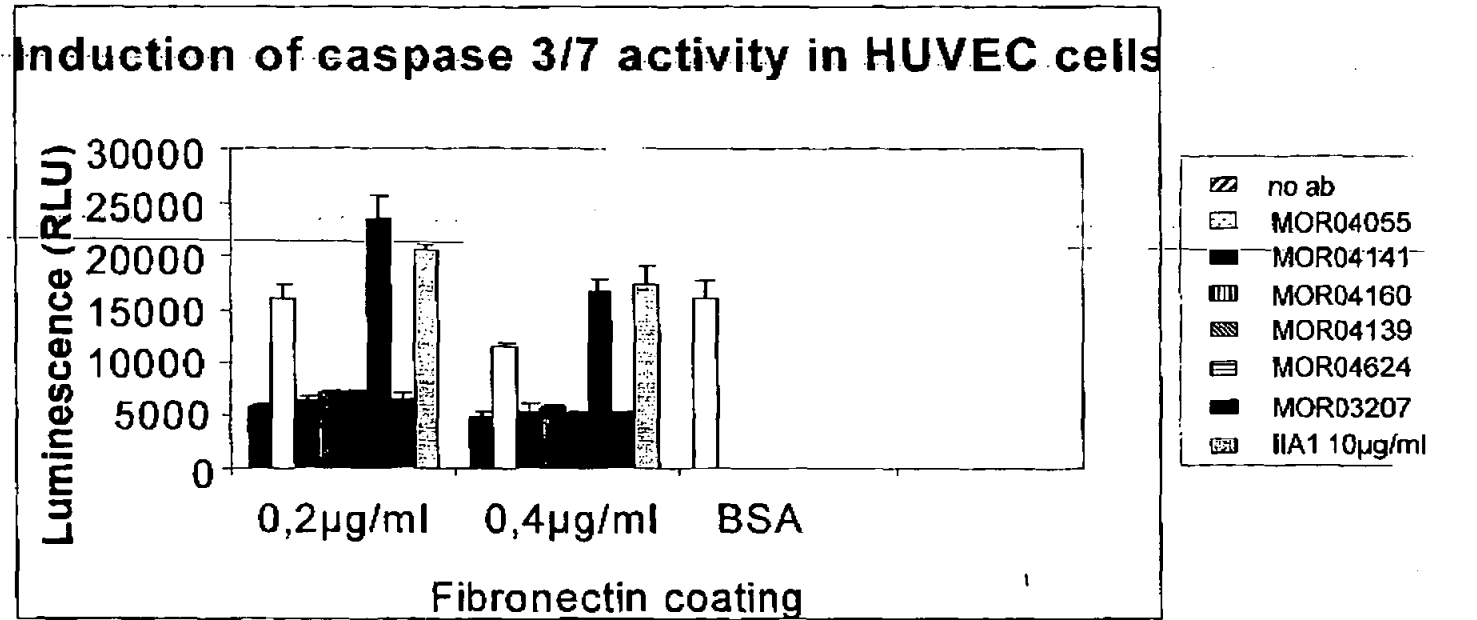


Figure 4:



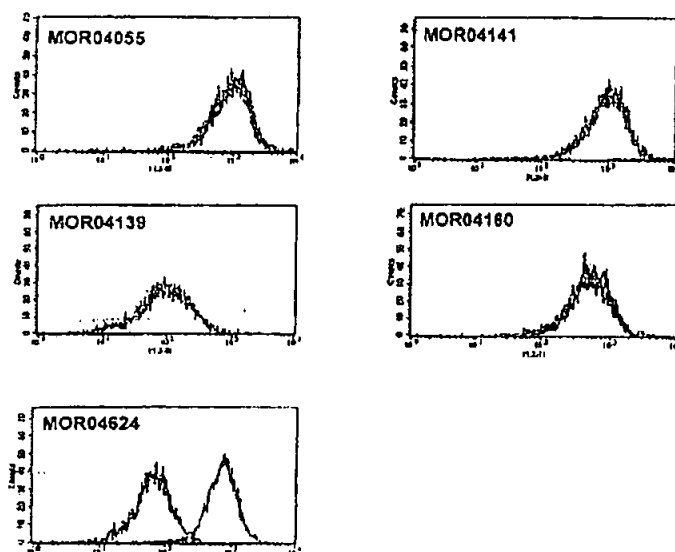


Figure 5

5

10

Figure 6:

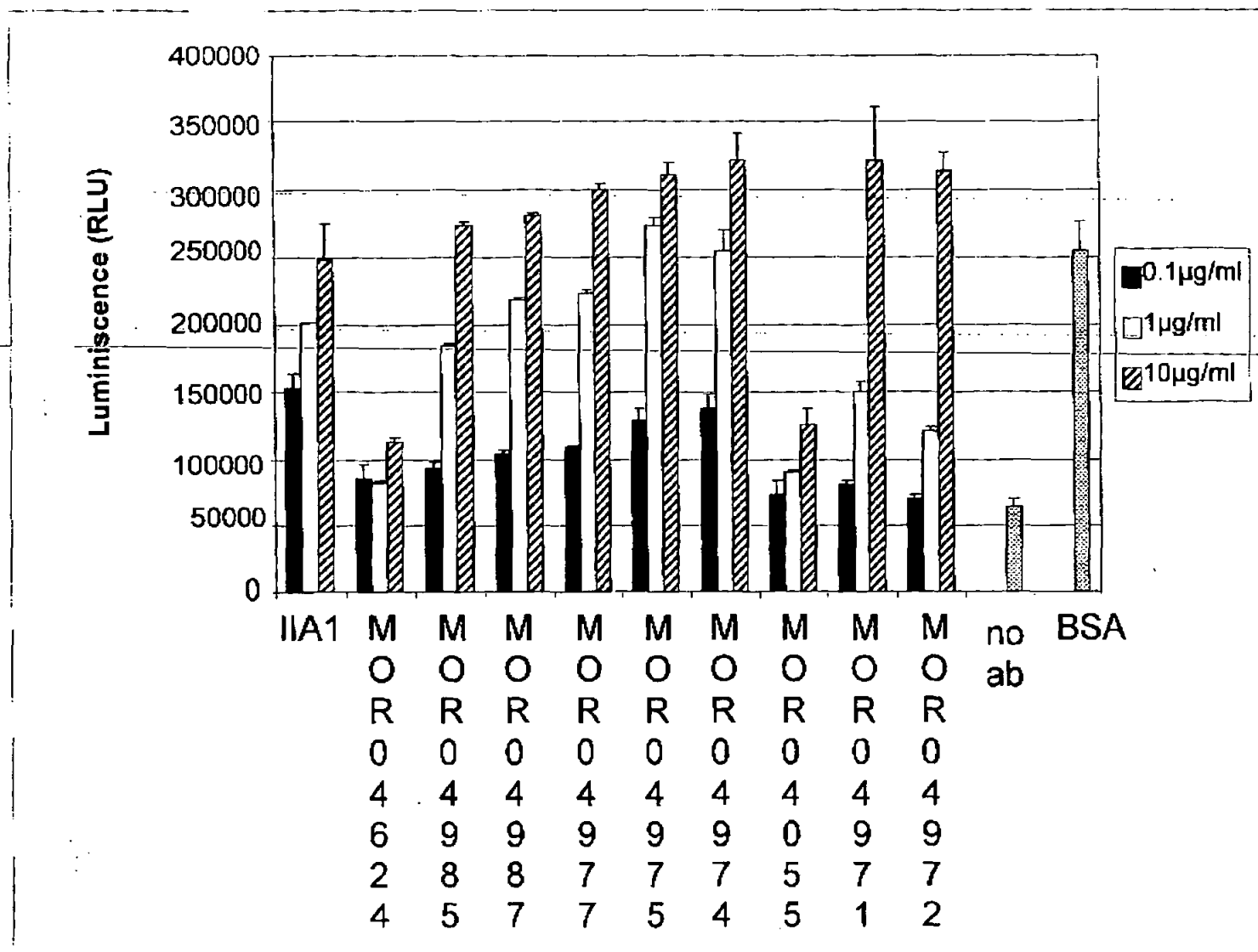


Figure 7:

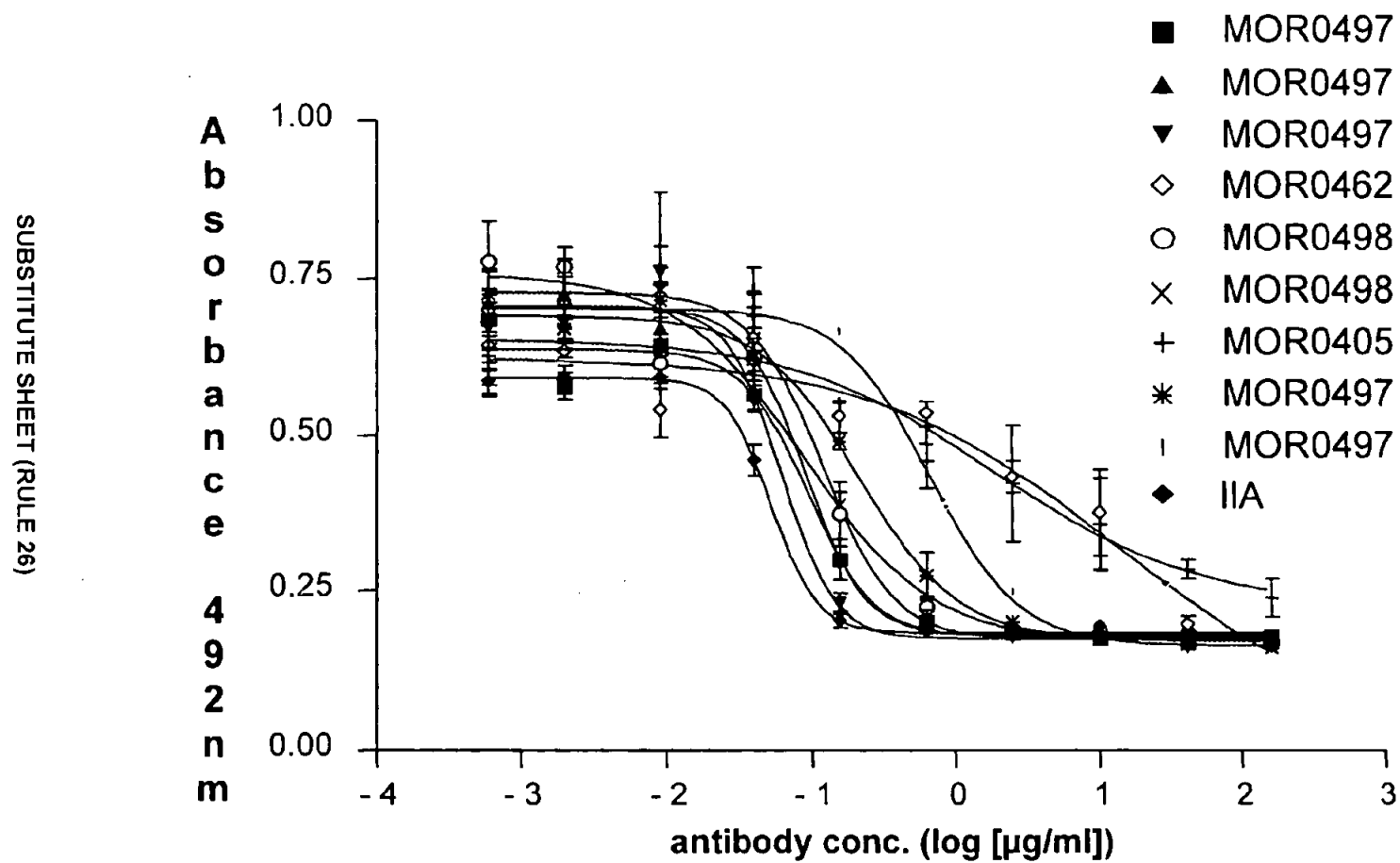
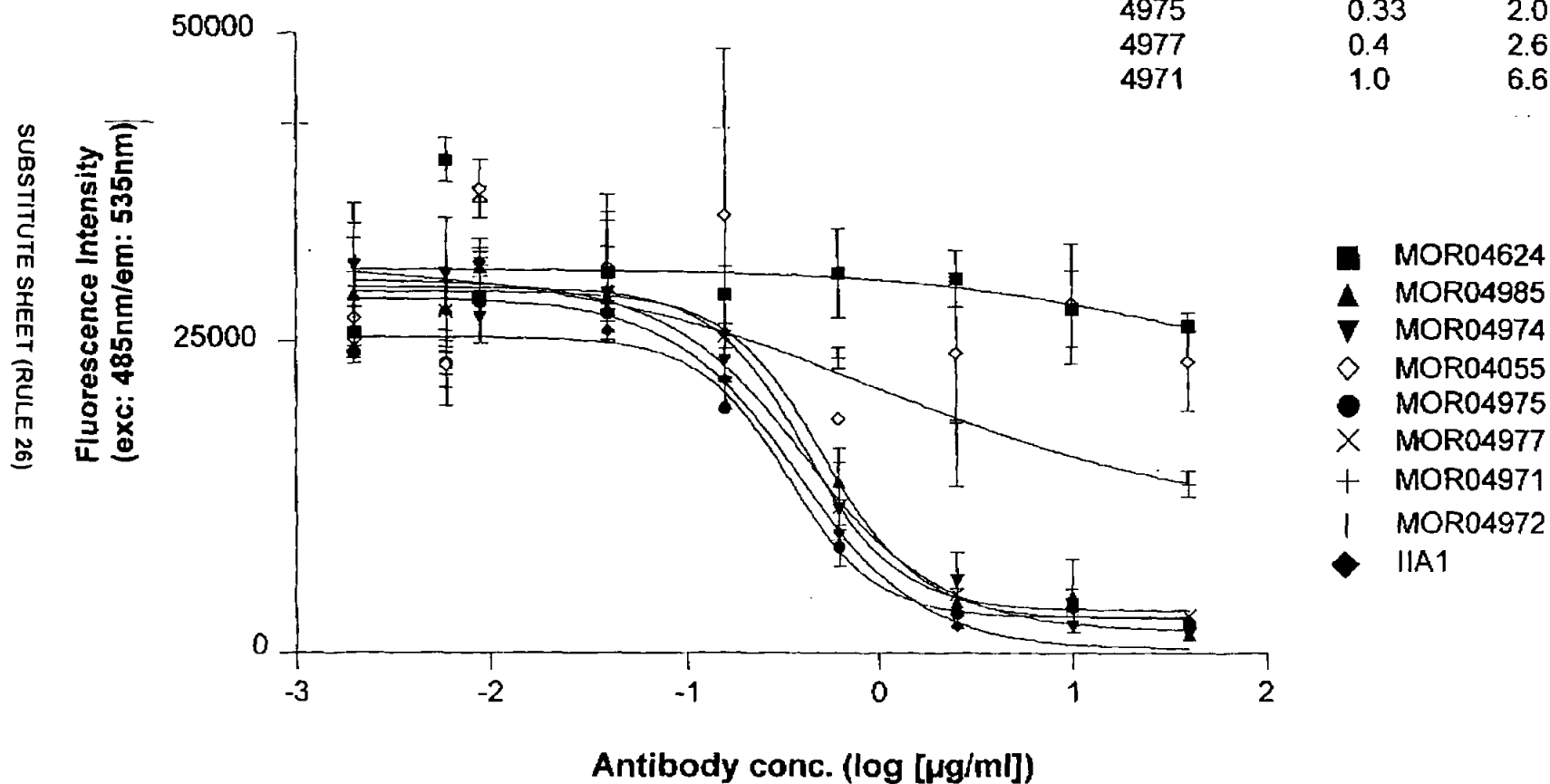


Figure 8:

**3CPF22 Adhesion assay lead integrin
IgGs**

MOR0#	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)	EC50 (nM)
4624	na	
4055	na	
IIA1	0.37	2.5
4985	0.5	3.3
4974	0.40	2.7
4975	0.33	2.0
4977	0.4	2.6
4971	1.0	6.6



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Figure 9:

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

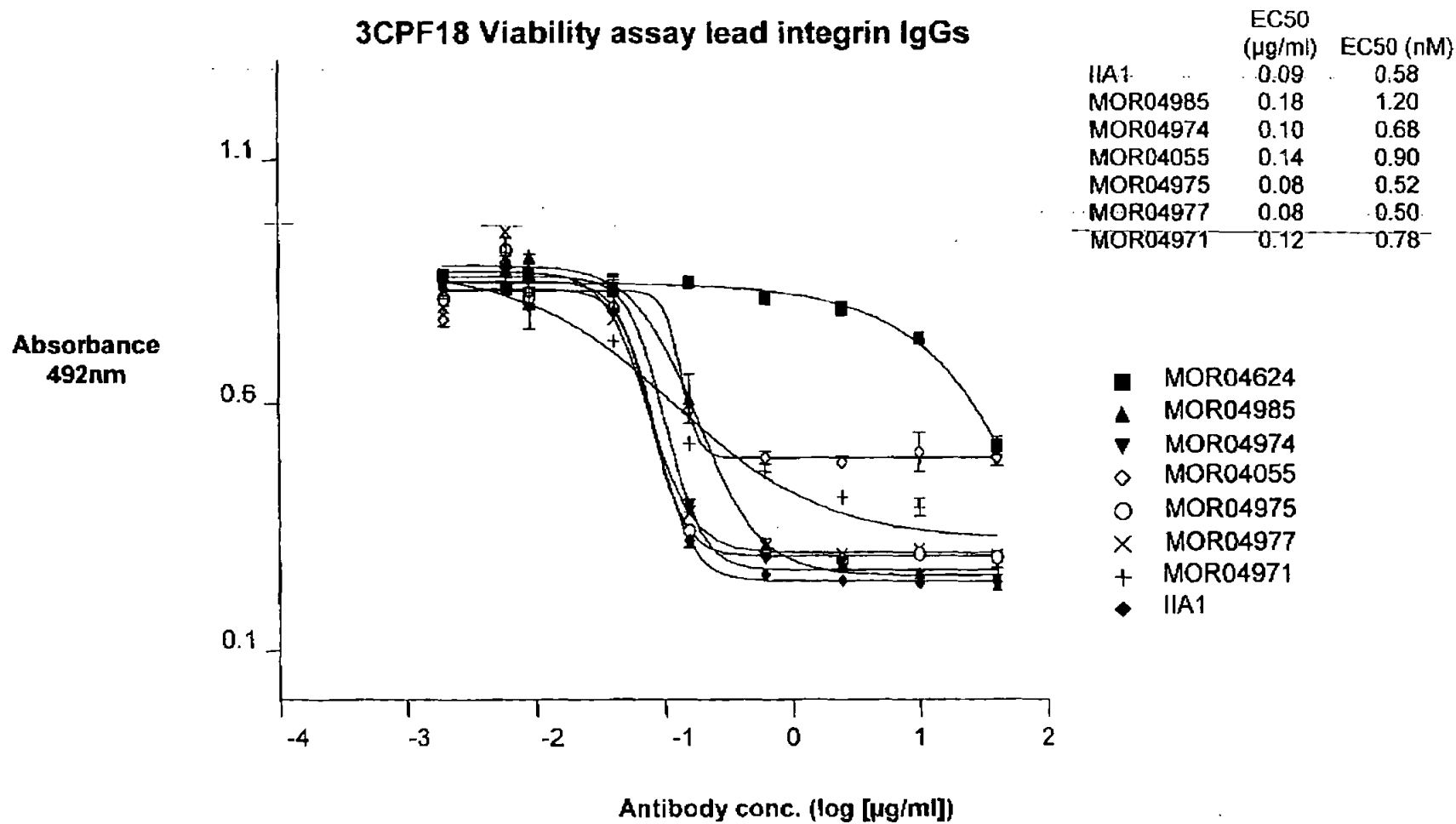


Figure 10:

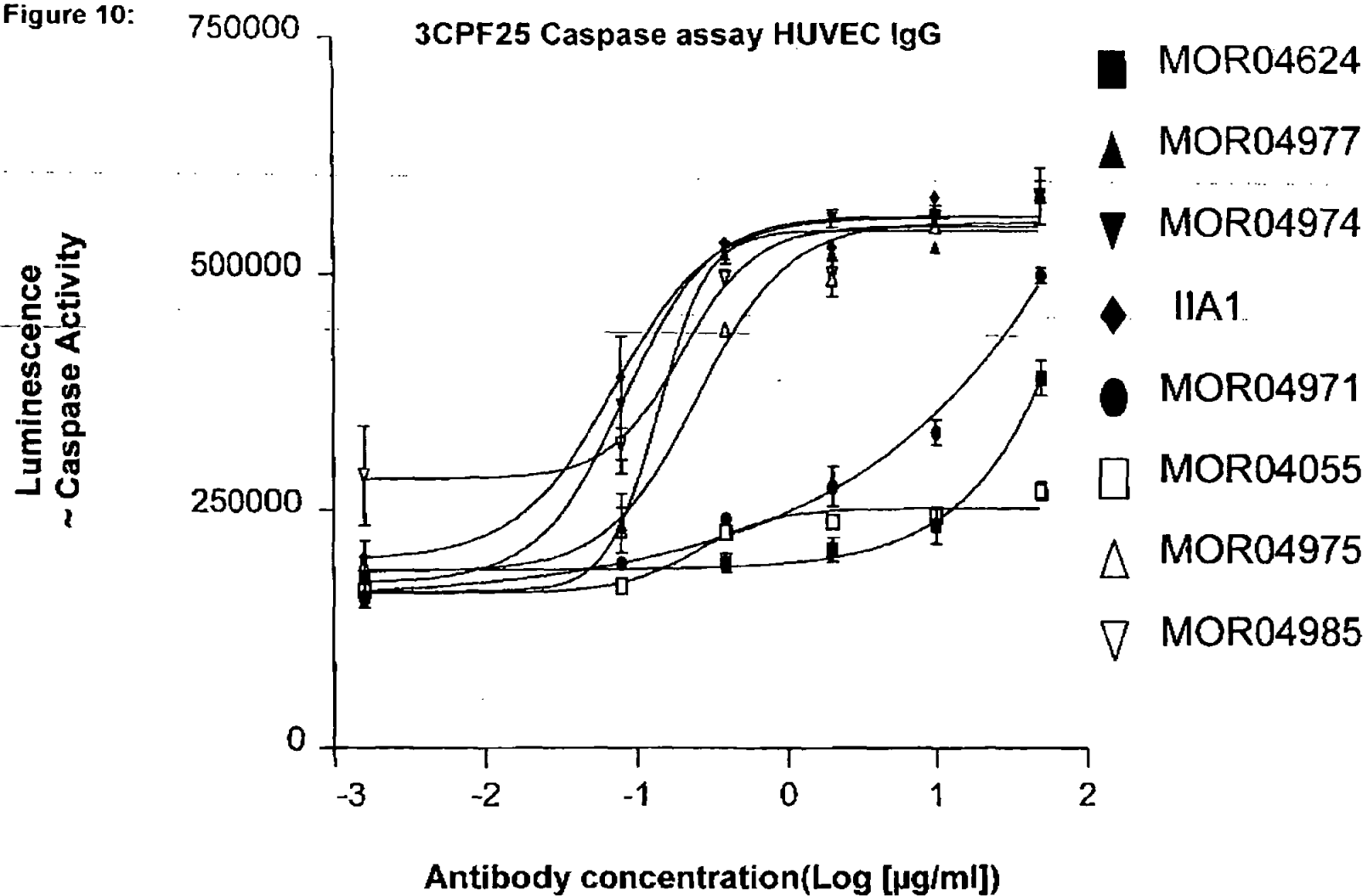
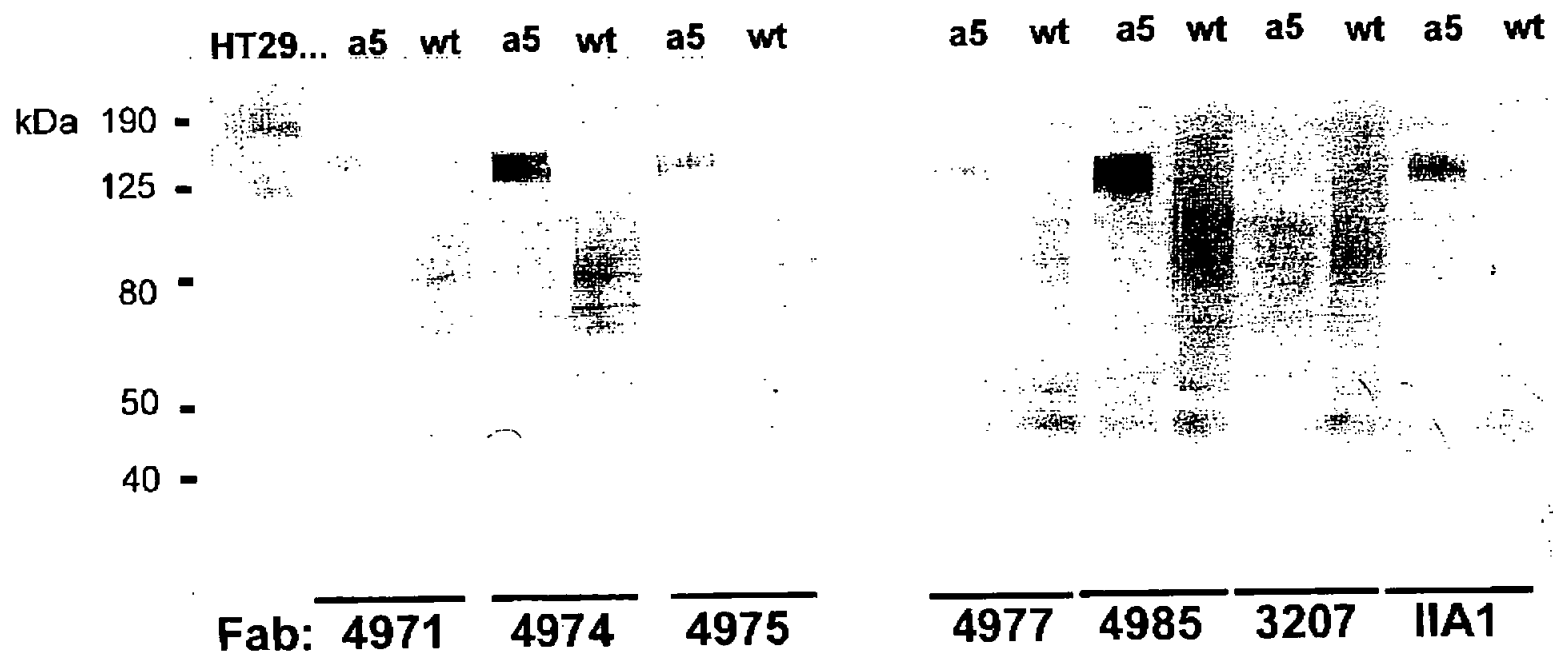


Figure 11:



75

Figure 12

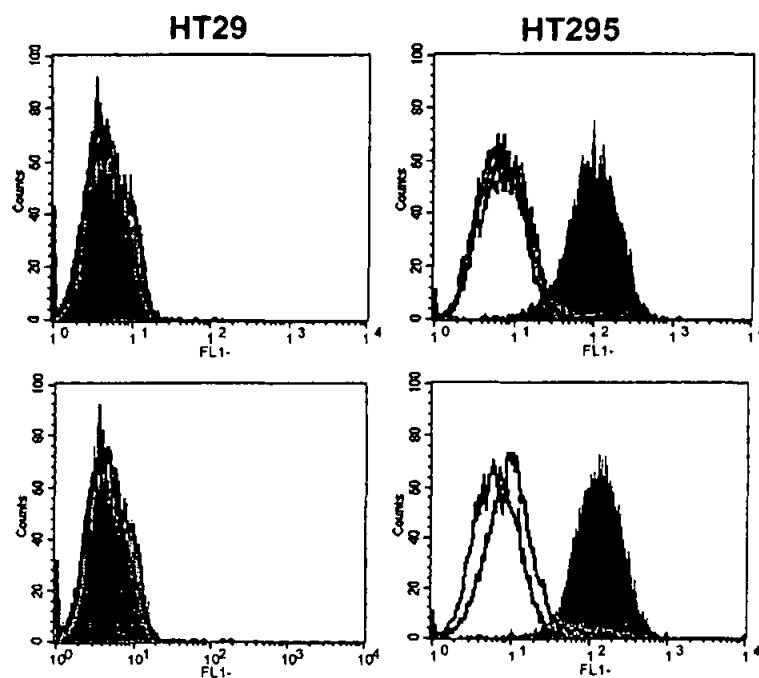
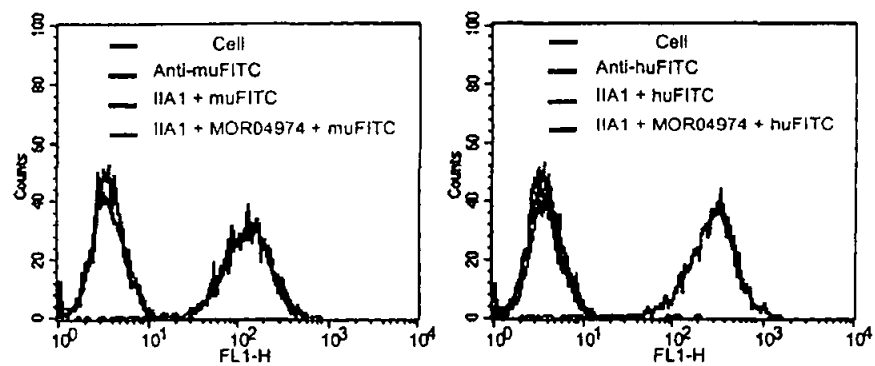


Figure 13

5



10

Figure 14

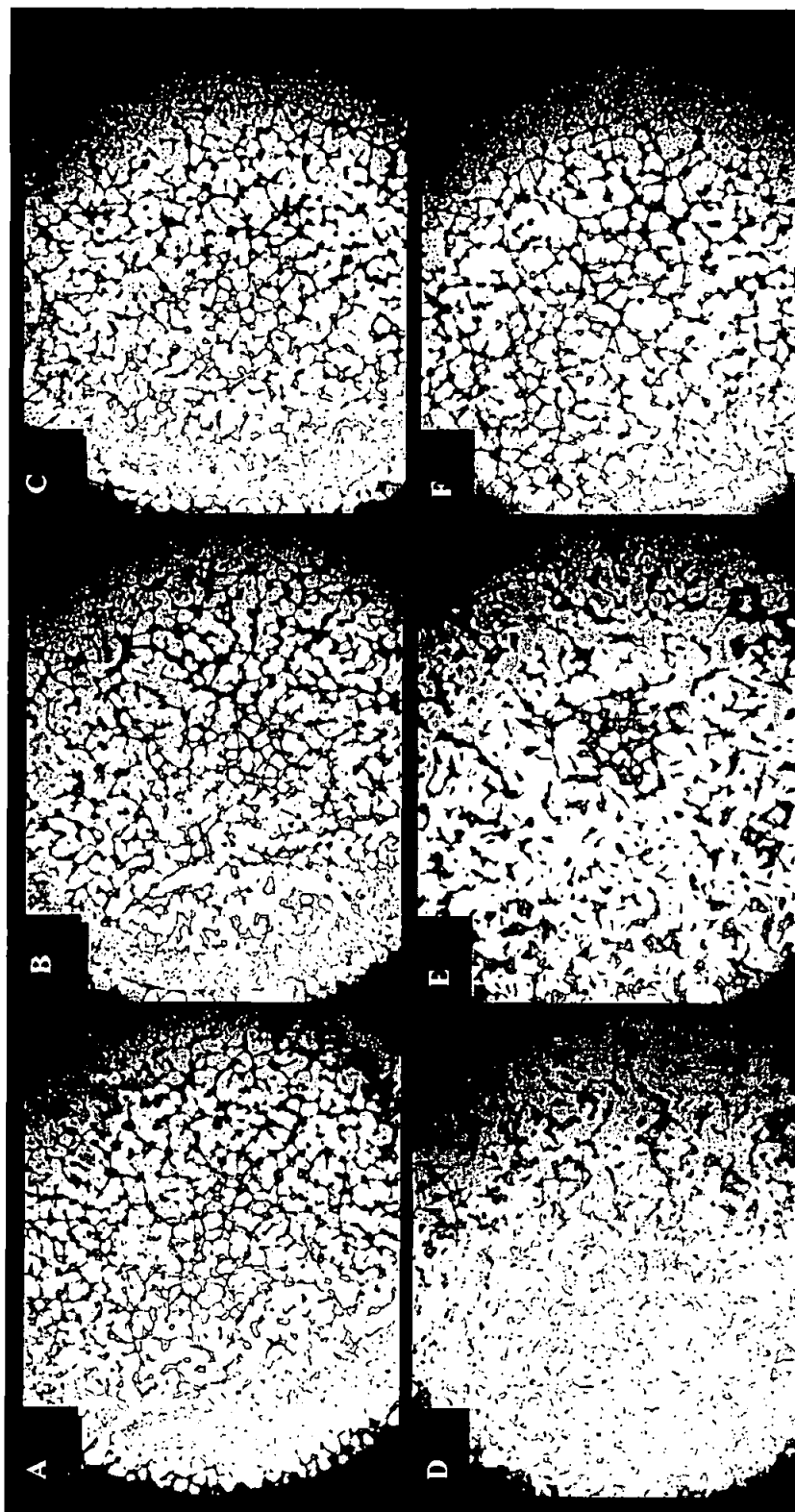
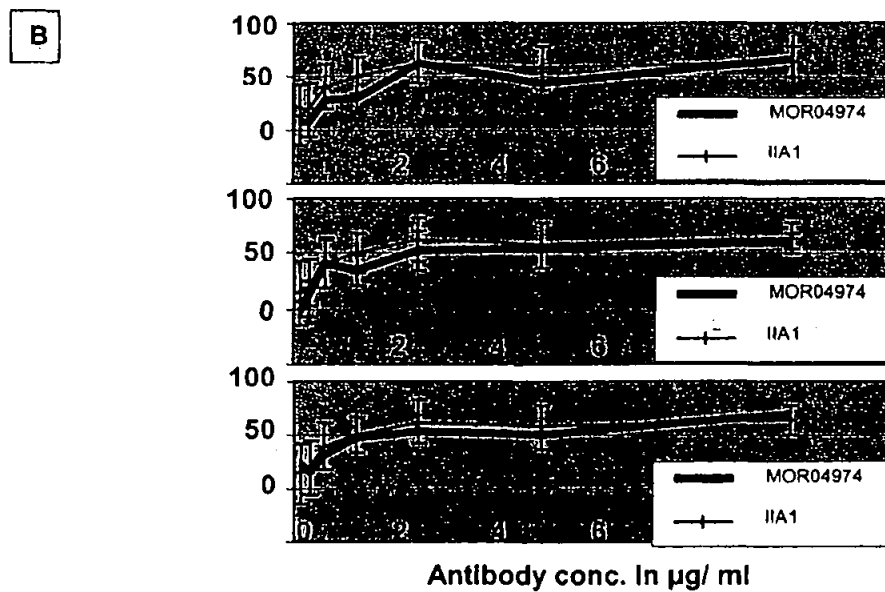


Figure 15

5



10

15

Figure 16

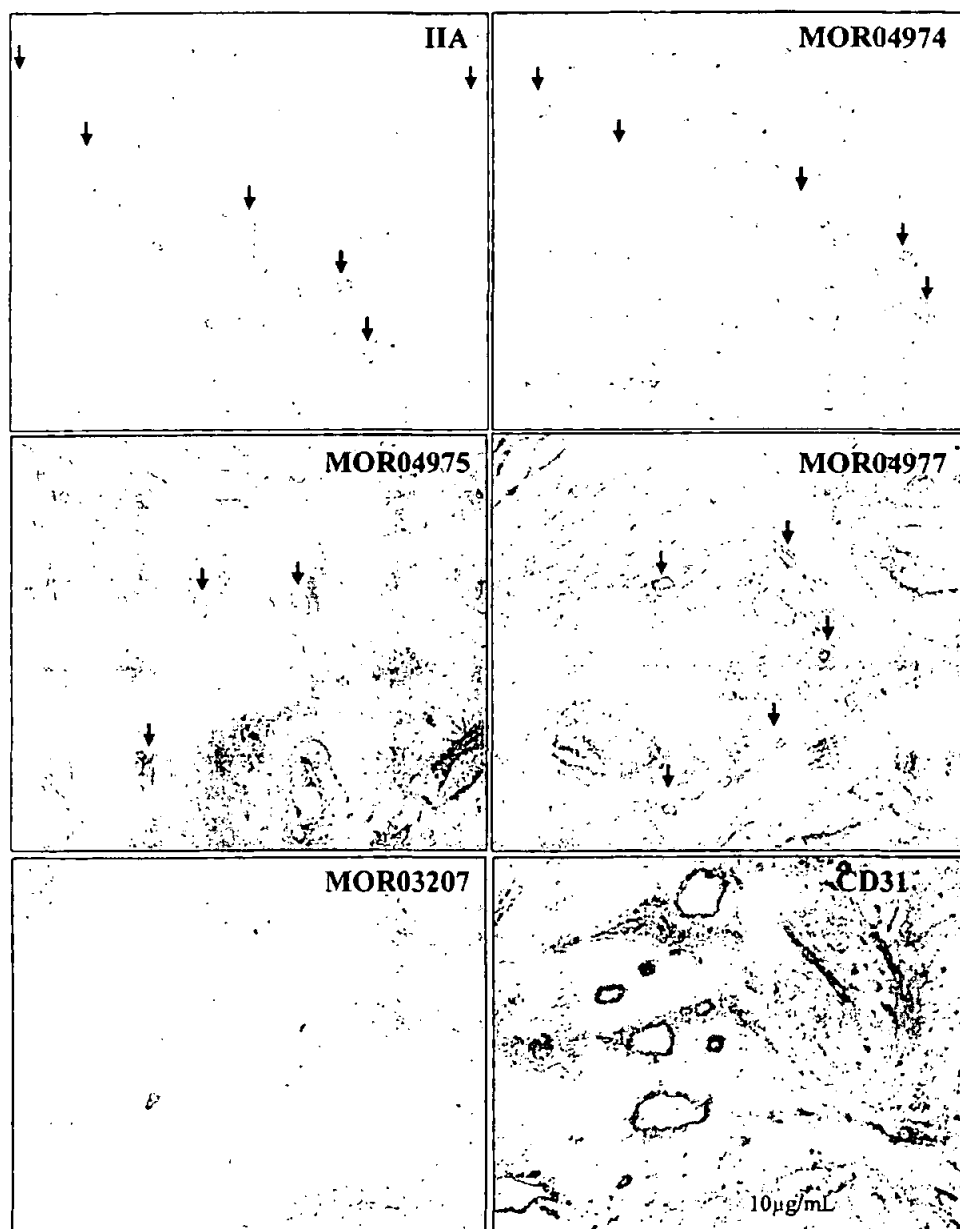
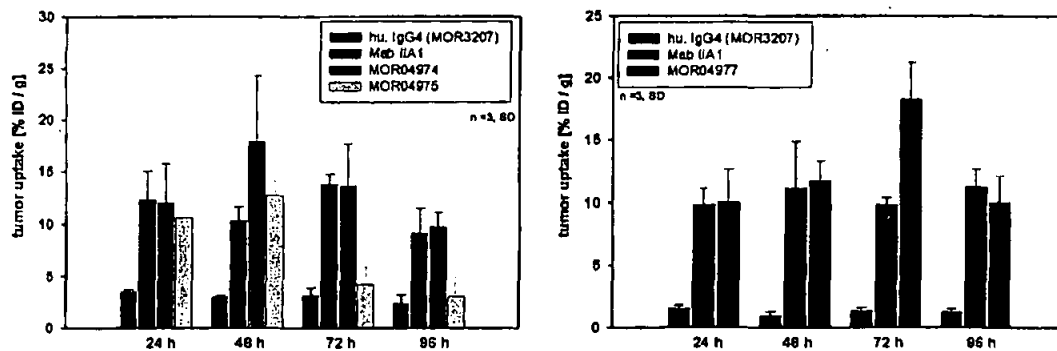


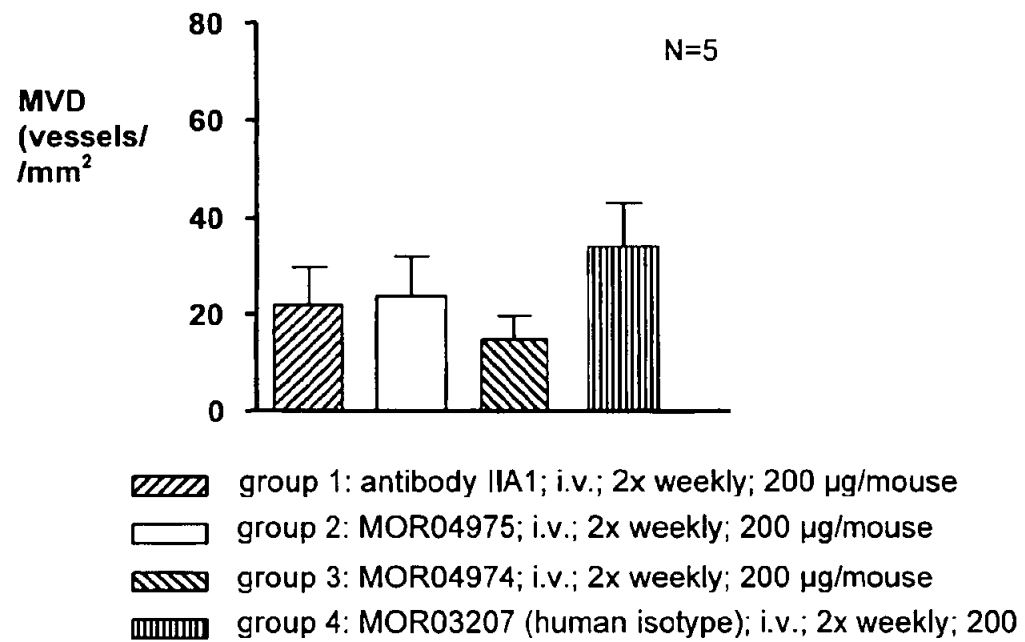
Figure 17



5

10

Figure 18



- (12) **Publicación de la solicitud internacional bajo PCT**
 (19) **Organización Mundial de Propiedad Intelectual**
Oficina Internacional
 (43) **Fecha de publicación internacional : 29 de noviembre de 2007 (29.11.2007)**
 (10) **Número de publicación internacional: WO 2007/134876 A2**
-

- (51) **Clasificación internacional de patentes:**
C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) **Número de solicitud internacional:** PCT/EP2007/04648
 (22) **Fecha de presentación internacional:** 21 de mayo de 2007 (21.05.2007)
 (25) **Idioma de la presentación:** inglés
 (26) **Idioma de la publicación:** inglés
 (30) **Datos de prioridad:**
 06 010 779.4 del 24 de mayo de 2006 (24.05.2006) EP
- (71) **Solicitante (para todos los estados designados con excepción de US):**
BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Muellerstrasse
 178, Alemania
- (72) **Solicitante (para todos los estados designados con excepción de US):**
MORPHOSYS AG [DE/DE]; Lena-Christ-Strasse 48, 82152 Martinsried/Planegg
 (DE).
- (72) **Inventores; y**
- (75) **Inventor/Solicitante (solamente para US):** **MENRAD, Andreas** [DE/GB]; 141
 Mainstreet Witschford, Ely Champs, Cambridgeshire CB6 2HP (GB). **WILLUDA,**
Jörg [DE/DE]; Platanenstrasse 3, 13156 Berlín, Alemania (DE). **BOSSLET,**
Klaus [DE/DE]; Im Amseltal 57, 13465 Berlín (DE). **ZOPF, Dieter** [DE/DE];
 Neuwerker Weg 15a, 14167 Berlín (DE). **PETRUL, Heike** [DE/DE]; Richard-
 Sorge Strasse 72, 10249 Berlín (DE). **STEIDL, Stefan** [DE/DE]; Planegger
 Strasse 37, 81241 Munich (DE). **PRASSLER, Josef** [DE/DE]; Kriegerstrasse
 8a, 82110 Germering (DE). **PETIT-FRÈRE, Corinne** [FR/DE]; Freibadstrasse
 20a, 81543 Munich (DE).
- (81) **Estados designados** (en la medida en que no se indique lo contrario, para cada
 tipo de protección nacional disponible): 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, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN,
 KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
 MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
 SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados designados** (en la medida en que no se indique lo contrario, para cada
 tipo de protección regional disponible): Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW,
 MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ,
 MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
 FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
 Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
 TG).

Publicado:

- sin el informe de búsqueda internacional y será vuelto a publicar en cuanto se reciba el mencionado informe

(48) **Fecha de publicación de la versión corregida:** 14 de febrero de 2008

(15) **Información acerca de la corrección:** ver Nota del 14 de febrero de 2008

(54) **Título:** ANTICUERPOS BLOQUEANTES DE LA FUNCIÓN DE LA INTEGRINA $\alpha 5 \beta 1$ HUMANOS Y HUMANIZADOS DE GRAN AFINIDAD CON INMUNOGENICIDAD REDUCIDA

(57) **Resumen:** Polipéptidos recombinantes humanos o humanizados que se unen a la integrina $\alpha 5 \beta 1$ con gran afinidad y bloquean su función. Además, se describen aplicaciones de diagnóstico y farmacéutico de los polipéptidos

**ANTICUERPOS BLOQUEANTES DE LA FUNCIÓN DE LA INTEGRINA $\alpha 5 \beta 1$
HUMANOS Y HUMANIZADOS DE GRAN AFINIDAD CON INMUNOGENICIDAD
REDUCIDA**

La presente invención se relaciona con polipéptidos recombinantes humanos o humanizados que se unen a la integrina $\alpha 5 \beta 1$ con gran afinidad y bloquean su función. Además, se describen aplicaciones de diagnóstico y farmacéuticas de los polipéptidos.

La angiogénesis es el proceso por el cual se desarrollan nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos promueve el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y el ciclo reproductor femenino. También cumple una función importante en el desarrollo patológico de distintos tipos de cáncer sólido y otras enfermedades por ejemplo hemangiomas, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, psoriasis, artritis reumatoide y posiblemente osteoartritis y enfermedad de intestino inflamatorio (1).

Los factores de crecimiento liberados por los tejidos tumorales hipóxicos estimulan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Aunque los factores de crecimiento y sus receptores cumplen funciones clave en la gemación angiogénica, la adhesión a la matriz extracelular (ECM) también es un regulador primario de la angiogénesis. La adhesión promueve la

sobrevida de células endoteliales, así como la proliferación y migración endotelial (2-5). Una proteína ECM particular, la fibronectina, se expresa en matrices provisionales (tumores) y provee señales proliferativas a las células vasculares (2,3). Notablemente, los ratones nulos para fibronectina mueren en una etapa temprana del desarrollo debido a un conjunto de defectos, que incluyen una vasculatura formada inapropiadamente (6,7).

Estudios en modelos de animales experimentales y en ratones mutantes indican que la integrina $\alpha 5\beta 1$, que es el receptor más importante para fibronectina, cumple una función clave en la regulación de la angiogénesis. La supresión embrionaria de esta integrina induce anomalías mesenquimáticas tempranas y letales, que incluyen defectos en la organización de la vasculatura emergente (8,9) y defectos en la capacidad de las células endoteliales para formar estructuras tipo vasos *in vitro* (10,11).

La expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ esta asociada específicamente con la angiogénesis: no es detectable en el endotelio quiescente pero se expresa como respuesta a los factores de crecimiento angiogénicos (3,4) *in vitro* o dentro de la vasculatura angiogénica de un tumor en crecimiento *in vivo* (12, 20, 21).

Kim et al. (3) pudieron demostrar que el anticuerpo bloqueante de la función de la integrina $\alpha 5\beta 1$ de ratón,

IIA1, inhibe la angiogénesis inducida por factores de crecimiento y en tumores *in vivo*. Estudios de las señales transducidas cuando se antagoniza esta integrina indican que el receptor no ligado activa la PKA, que luego activa las caspasas 3 y 8 e induce apoptosis (2,13).

Se ha intentado preparar derivados humanizados del anticuerpo IIA1 de ratón (BD Pharmingen, N° Cat. 555614). Como resultado de ello, se generó un anticuerpo monoclonal IgG4 quimérico 82% humano/18% de ratón denominado M200. Además, se ha generado un fragmento Fab monovalente de M200, denominado F200, y se ha evaluado con éxito en un modelo en macacos de degeneración macular. Además se ha intentado preparar derivados de anticuerpos completamente humanizados de M200 que, no obstante, dieron como resultado una pérdida dramática de la bioactividad (14).

Cualquier aplicación de los anticuerpos conocidos actualmente contra la integrina $\alpha 5\beta 1$, tal como M200 o F200, en medicina humana tiene el riesgo de inducir una respuesta inmunogénica de anticuerpos humanos anti-quiméricos (HACA) en pacientes humanos. Por consiguiente, un objeto de la presente invención era proveer anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ humanos que tienen una inmunogenicidad reducida en comparación con los anticuerpos quiméricos existentes, en tanto retiene la especificidad del blanco y una gran bioactividad y afinidad.

De acuerdo con la presente invención, anticuerpos completamente humanos en el formato Fab fueron aislados de una biblioteca de anticuerpos HuCAL[®]-Gold mediante expresión en fagos usando células transfectadas con integrina $\alpha 5\beta 1$. Estos anticuerpos muestran una gran actividad *in vitro* en tanto se puede esperar una baja inmunogenicidad en pacientes humanos debido al origen completamente humano.

Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención es un anticuerpo humano o humanizado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que (i) se une a la integrina $\alpha 5\beta 1$ con una afinidad de 100 nM y preferentemente ≤ 10 nM y (ii) inhibe la adhesión de las células que expresan integrina $\alpha 5\beta 1$ a su receptor *in vitro* e *in vivo*.

El polipéptido de la presente invención es un anticuerpo humano o humanizado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo. El término „anticuerpo humano” de acuerdo con la presente invención se relaciona con moléculas de anticuerpo que tienen dominios variables sustancialmente humanos o completamente humanos y, si están presentes, dominios constantes humanos. El término „humano”, según se usa en la presente solicitud, se relaciona con secuencias que se pueden formar en seres humanos individuales o mediante el uso de las secuencias consenso que resultan de las mismas, por ejemplo como se describe en el correspondiente compendio de Kabat et al. (1991), *Sequences of Proteins of immunological Interest*,

5ª Edición, publicación del NIH N° 91-3242, *US Department of Health and Human Services*, Washington, DC, que se incorpora en la presente a modo de referencia. El término „sustancialmente humano“ se refiere a secuencias que pueden diferir de las secuencias „completamente humanas“, descritas por Kabat et al., en hasta 1, 2, 3, 4 ó 5 aminoácidos. Más particularmente, los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo, de acuerdo con la presente invención comprenden regiones de marco de trabajo variables sustancialmente o completamente humanas en las cadenas de inmunoglobulina pesada (H) y liviana (L). El término „anticuerpo humanizado“ en el sentido de la presente invención se relaciona con moléculas de anticuerpo que contienen dominios variables sustancialmente murinos o completamente murinos y dominios constantes humanos o sustancialmente humanos, y que son > 82%, preferentemente al menos 90% y con especial preferencia al menos 98% humanos. El término „murino“ según se usa en la presente solicitud se relaciona con secuencias que se pueden formar en roedores individuales o mediante el uso de secuencias consenso resultantes de las mismas. El término „sustancialmente murino“ se refiere a secuencias que pueden diferir de las secuencias „completamente murinas“ en hasta 1, 2, 3, 4 ó 5 aminoácidos. Preferentemente, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo del mismo, es un anticuerpo IgG, por ejemplo un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano o humanizado, o un

fragmento del mismo, por ejemplo un fragmento Fab, Fab' o (Fab)₂. Sin embargo, la presente invención también se relaciona con anticuerpos recombinantes que contienen secuencias humanas, por ejemplo anticuerpos de cadena simple (sc), o un fragmento de los mismos, p.ej. fragmentos scFv.

Los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo, de la presente invención contienen uno o más sitios de unión al antígeno que interactúan específicamente con la integrina $\alpha 5 \beta 1$. Preferentemente, estas propiedades de unión al antígeno se obtienen combinando una región de la cadena pesada variable (VH) con la de una cadena liviana variable (VL). Una región VH o VL incluye regiones de marco de trabajo (FR1, FR2, FR3 y FR4) y regiones CDR que intervienen en la unión al antígeno (H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3 para la región VH y L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 para la región VL).

El anticuerpo humano o humanizado, o fragmento de anticuerpo, de la invención tiene preferentemente una afinidad por la integrina $\alpha 5 \beta 1$ correspondiente a un valor de $K_D \leq 100$ nM, preferentemente ≤ 10 nM y con mayor preferencia ≤ 1 nM, en donde la afinidad se determina por titulación FACS en células HUVEC humanas $\alpha 5 \beta 1$ -positivas según se describe en los ejemplos o por medición de competencia BIAcore o de competencia ELISA.

Además, los polipéptidos de la invención inhiben la adhesión de una célula tumoral humana que expresa la integrina

$\alpha 5\beta 1$ como se describe en los ejemplos, p.ej. las células K562 (ATCC, N° Acceso: CCL-243) estudiadas por Lozzio et al. (1979), *Leukemia Research*, 3: 363-370, *in vitro*. Preferentemente, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, muestra una inhibición del 50% de la adhesión celular a una concentración (IC_{50}) ≤ 10 nM y preferentemente ≤ 5 nM.

Además, los polipéptidos de la invención tienen preferentemente la capacidad para inducir actividad caspasa en células HUVEC. El valor IC_{50} , con respecto a la viabilidad de HUVEC, es preferentemente ≤ 10 nM, más preferentemente ≤ 5 nM, en donde el valor IC_{50} (50% de viabilidad) se determina como se describe en los ejemplos.

Además, los polipéptidos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención se pueden usar preferentemente para el diagnóstico y la prevención y el tratamiento de tumores y cáncer, en especial carcinoma de colon.

Dichos polipéptidos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo se pueden conjugar con grupos de marcación detectables, tal como grupos de marcación radioactivos, NMR, colorantes, enzimas y fluorescentes. Los grupos radioactivos pueden ser, por ejemplo, I^{125} , I^{131} o Y^{90} .

Preferentemente, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de la invención comprende:

- (a) una región VH seleccionada entre
 - (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1

(MOR04624), la SEQ ID N°: 3 (MOR04055) o al menos una región H-CDR1, H-CDR2 y/o H-CDR3 de una de dichas regiones de VH o

(ii) una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de (i) por alteración de al menos una región H-CDR y/o

(b) una región VL seleccionada entre

(i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2 (MOR04624), la SEQ ID N°: 4 (MOR04055) o al menos una región L-CDR1, L-CDR2 y/o L-CDR3 de una de dichas regiones VL o

(ii) una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de (i) por alteración de al menos una región L-CDR.

Es especialmente preferido un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende una región VH derivada de una región VH de (a) (i) descrita precedentemente por randomización de la región H-CDR2.

En otra realización especialmente preferida, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, comprende una región VL derivada de una región VL de (b) (i) descrita precedentemente por randomización de la región L-CDR3.

En aún otra realización especialmente preferida, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, comprende una región VH y/o VL derivada de una región VH de (a) (i) y/o una región

VL de (b) (i) por entremezclado de las cadenas de anticuerpo.

Se generan sub-bibliotecas de H-CDR2 y L-CDR3 por intercambio de H-CDR2 y L-CDR3, respectivamente, con repertorios de CDR humanas usando métodos de ingeniería de proteínas (17).

Por ejemplo, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, comprende una región VH y/o VL derivada de la región VL y/o VH descrita en la SEQ ID N°: 1 o la SEQ ID N°: 2 (MOR04624). Es especialmente preferido un polipéptido que comprende:

- (a) una región VH seleccionada entre secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 5 (MOR04971), SEQ ID N°: 7 (MOR04974), SEQ ID N°: 9 (MOR04975), SEQ ID N°: 11 (MOR04977), y SEQ ID NO. 11 (MOR04985) o al menos una región H-CDR1, H-CDR2 y/o H-CDR3 de dichas regiones VH, y/o
- (b) una región VL seleccionada entre las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6 (MOR04971), SEQ ID N°: 8 (MOR04974), SEQ ID N°: 10 (MOR04975), SEQ ID N°: 12 (MOR04977) y SEQ ID N°: 14 (MOR04985), o al menos una región L-CDR1, L-CDR2 y/o L-CDR3 de dicha región VL.

Los ejemplos específicos de polipéptidos de la presente invención son:

Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende la región VH de la SEQ ID N°: 1 y la región VL de la SEQ ID

Nº: 2 (MOR04624) o al menos una región H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3 de las mismas.

Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende la región VH de la SEQ ID Nº: 3 y la región VL de la SEQ ID Nº: 4 (MOR04055) o al menos una región H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3 de las mismas.

Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende la región VH de la SEQ ID Nº: 5 y la región VL de la SEQ ID Nº: 6 (MOR04971) o al menos una región H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3 de las mismas.

Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende la región VH de la SEQ ID Nº: 7 y la región VL de la SEQ ID Nº: 8 (MOR04974) o al menos una región H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3 de las mismas.

Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende la región VH de la SEQ ID Nº: 9 y la región VL de la SEQ ID Nº: 10 (MOR04975) o al menos una región H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3 de las mismas.

Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende la región VH de la SEQ ID Nº: 11 y la región VL de la SEQ ID Nº: 12 (MOR04977) o al menos una región H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3 de las mismas.

Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende la región VH de la SEQ ID Nº: 13 y la región VL de la SEQ ID Nº: 14 (MOR04985) o al menos una región H-CDR1, H-CDR2, H-

CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3 de las mismas.

La invención también se refiere a anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dirigidos contra el mismo epítopo sobre el antígeno que los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo, preferidos y/o ejemplificados mencionados previamente.

Las cadenas VH y VL del polipéptido comprende las siguientes regiones:

la cadena VH de MOR04624, MOR04055 y derivados (esquema de numeración de acuerdo con (17)):

- La región del marco de trabajo 1 que se extiende entre los aminoácidos 1 y 30
- La región CDR1 que se extiende entre los aminoácidos 31 y 35
- La región del marco de trabajo 2 que se extiende entre los aminoácidos 36 y 49
- La región CDR2 que se extiende entre los aminoácidos 50 y 65
- La región del marco de trabajo 3 que se extiende entre los aminoácidos 66 y 94
- La región CDR3 que se extiende entre los aminoácidos 95 y 102
- La región del marco de trabajo 4 que se extiende entre los aminoácidos 103 y 113

la cadena VLk1 de MOR04624 y derivados de la misma (esquema de numeración de acuerdo con (17)):

la región del marco de trabajo 1 que se extiende entre los aminoácidos 1 y 23

la región CDR1 que se extiende entre los aminoácidos 24 y 35

la región del marco de trabajo 2 que se extiende entre los aminoácidos 36 y 50

la región CDR2 que se extiende entre los aminoácidos 51 y 57

la región del marco de trabajo 3 que se extiende entre los aminoácidos 59 y 89

la región CDR3 que se extiende entre los aminoácidos 90 y 98

la región del marco de trabajo 4 región que se extiende entre los aminoácidos 99 y 109

La cadena VLk1 de MOR04055 y derivados (esquema de numeración de acuerdo con (17)):

la región del marco de trabajo 1 que se extiende entre los aminoácidos 1 y 23

la región CDR1 que se extiende entre los aminoácidos 24 y 35

la región del marco de trabajo 2 que se extiende entre los aminoácidos 36 y 50

la región CDR2 que se extiende entre los aminoácidos 51 y 57

la región del marco de trabajo 3 que se extiende entre los aminoácidos 58 y 89

la región CDR3 que se extiende entre los aminoácidos 90 y 98

la región del marco de trabajo 4 que se extiende entre los aminoácidos 99 y 109

Las regiones de marco de trabajo de la cadena VH y/o VL

se pueden alterar por intercambio de uno o más aminoácidos, p.ej. 1, 2, 3, 4 ó 5 aminoácidos. Por ejemplo, se puede alterar la región del marco de trabajo 3 de la cadena VLk1 en los miembros de la familia MOR04624. Preferentemente, el aminoácido de la posición 85 de la secuencia del Fab es intercambiable, siendo especialmente preferido un intercambio de valina (MOR04624, MOR04985) por treonina (MOR04974, -75, -77). Además, se puede alterar la región del marco de trabajo 1 de la cadena VH. En una realización preferida, se puede intercambiar el aminoácido de la posición 3 de cada secuencia de VH-Fab. Se prefiere especialmente un intercambio de glutamina (q) por ácido glutámico (e) que puede tener lugar, p.ej., durante la clonación.

El polipéptido de la invención es adecuado para aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico, por ejemplo para aplicaciones de diagnóstico *in vitro* o *in vivo*.

Para las aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, se puede usar como tal. Como alternativa, el polipéptido se puede encontrar en la forma de un conjugado con un agente terapéutico seleccionado, por ejemplo, entre agentes radioterapéuticos o agentes quimioterapéuticos, por ejemplo agentes de bajo peso molecular o citostáticos biológicos o citotóxicos. El agente terapéutico se puede conjugar al anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de acuerdo con métodos conocidos, preferentemente a través

de un enlace covalente a grupos reactivos de amino, carboxi, hidroxí y/o sulfhidrilo del polipéptido, opcionalmente usando ligadores homo- o hetero-bifuncionales.

En una realización adicional, el polipéptido se puede encontrar en la forma de una proteína de fusión que comprende un dominio de un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, y un dominio de fusión heterólogo, por ejemplo una citoquina, tal como IL-2, IL-12 o TNF- α . Otros miembros de fusión terapéuticamente relevantes de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la invención comprenden las partes Fc IgG manipuladas para una mayor o menor reclutamiento de células inmunoefectoras, toxinas proteicas tal como RNAsas o ETA, pequeñas moléculas de droga, tal como derivados de maytansina o auristatina, enzimas para la activación de prodrogas, proteínas de fusión con otros antagonistas bloqueantes de la función de integrinas o proteínas de fusión con enzimas que tienen actividad antiangiogénica, tal como MMP-2 o MMP-9 (15). Además, la proteína de fusión se puede encontrar en la forma de un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un dominio de unión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ descrita precedentemente y un dominio de unión específico de otro antígeno. Por ejemplo, el segundo dominio de unión al antígeno puede estar dirigido contra agentes quelantes para radionucleótidos de diagnóstico y/o terapéuticos, por ejemplo radionúclidos emisores de radiación alfa, beta o gamma tal co-

mo ^{90}Y , colorantes de diagnóstico del NIR (infrarrojo cercano), colorantes terapéuticamente activos, moléculas de superficie sobre células efectoras inmunológicas, por ejemplo células NK, células T citotóxicas o células T NK, dominios de unión anti-VEGF bloqueantes funcionales y dominios de unión bloqueantes de la función contra el receptor de VEGF 1, 2 y 3 y citoquinas tales como interleuquinas.

Para las aplicaciones de diagnóstico, el polipéptido se puede encontrar en la forma de un conjugado con un grupo de marcación detectable, p.ej. un grupo de marcación para una aplicación de diagnóstico *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, el grupo de marcación detectable se puede seleccionar entre grupos de marcación radioactivos, NMR, colorantes, enzimas y fluorescentes (p.ej., fluorescentes del NIR).

Para las aplicaciones terapéuticas, el polipéptido se formula preferentemente en una composición farmacéutica que además puede comprender otros ingredientes activos y/o vehículos, diluyentes y/o adyuvantes aceptables para uso farmacéutico. La composición farmacéutica comprende al agente activo en una dosis terapéuticamente activa, que el especialista puede determinar de acuerdo con métodos estándar, por ejemplo mediante experimentos *in vitro* o en modelos de animales. La composición es administrada preferentemente por infusión, inyección o inhalación. La dosis de ingrediente activo se determina de acuerdo con el tipo y la severidad

del trastorno y la constitución del paciente a tratar. Preferentemente, la composición terapéutica es administrada en varias dosis sobre un tiempo de al menos 2-4 semanas. En este contexto, se hace referencia a protocolos conocidos para la administración de anticuerpos o anticuerpos conjugados, por ejemplo según se describe en Ferrara et al. *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 3, mayo de 2004, 391-400 y Salgaller, *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2003, 5(6), 657-667 o a protocolos de administración de anticuerpos farmacéuticos tipo Rituximab, Campath, Remicade, etc.

Además, la invención se relaciona con una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, descrita precedentemente como un reactivo de diagnóstico. La composición de diagnóstico además puede comprender reactivos, vehículos, diluyentes y/o adyuvantes aceptables para uso diagnóstico. La composición de diagnóstico comprende al polipéptido en una cantidad suficiente para permitir la detección de diagnóstico en el formato de ensayo respectivo, por ejemplo en un formato de ensayo de diagnóstico *in vivo* o *in vitro*.

La composición se puede usar para aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico en los trastornos asociados con la integrina $\alpha 5\beta 1$. Por ejemplo, estos trastornos pueden ser trastornos hiperproliferativos, por ejemplo trastornos asociados con angiogénesis y/o metástasis, en particular cán-

cer. Los distintos tipos de cáncer que pueden ser tratados con la composición de acuerdo con la invención comprenden particularmente todos los tipos de tumores sólidos, por ejemplo cáncer de colon, riñón, pulmón, próstata, mama, cerebro, estómago, hígado o piel. Como alternativa, las composiciones se pueden emplear en el tratamiento de los tipos de cáncer hematológicos asociados con una angiogénesis. Otros trastornos asociados con una neovascularización comprenden, pero en un sentido no taxativo, endometriosis, hemangioma, artritis reumatoide, osteoartritis, placas arterioscleróticas, enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedad inflamatoria del CNS, psoriasis, trastornos oftalmológicos tales como retinopatía diabética o enfermedad macular relacionada con la edad y cicatrices hipertróficas. En una realización preferida, la actividad antiangiogénica de la composición es independiente de los factores de crecimiento.

La composición puede comprender uno o varios anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, por ejemplo una combinación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen a diferentes dominios de la integrina $\alpha 5 \beta 1$. La composición también puede contener drogas de moléculas pequeñas para una terapia combinada. La composición es adecuada para aplicaciones en medicina humana y veterinaria. Se prefiere especialmente una aplicación en medicina humana.

Además, la presente invención se relaciona con un ácido

nucleico que codifica un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, o un polipéptido de fusión descrito precedentemente. El ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ADN o ARN de cadena simple o de cadena doble. Preferentemente, el ácido nucleico está ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión, que permite la expresión en una célula huésped u organismo huésped adecuado. El ácido nucleico puede encontrarse en un vector o un sistema de vectores, (es decir, una pluralidad de vectores) que puede introducirse en una célula huésped u organismo huésped. El vector puede ser un vector procariota adecuado para células procariotas, por ejemplo un plásmido o bacteriófago. Además, el vector puede ser un vector eucariota para células huésped u organismos huésped eucariotas, por ejemplo un plásmido, un cromosoma artificial o un vector viral. Los vectores adecuados se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press y Ausubel et al. (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons.

La presente invención también se refiere a una célula, por ejemplo una célula procariota o una célula eucariota, tal como una célula humana, que es transformada con un ácido nucleico o un vector descrito precedentemente. Aún más, la invención se relaciona con un organismo no humano, p.ej. un animal transgénico, tal como un mamífero no humano transgé-

nico, que es transformado con un ácido nucleico o vector descrito precedentemente. El término „transformación” incluye todos los métodos para introducir ácidos nucleicos extraños en una célula o un organismo incluyendo transfección o infección.

El polipéptido se puede preparar cultivando una célula o un organismo no humano descrito precedentemente bajo condiciones que permitan expresar el polipéptido y luego se recupera el polipéptido expresado, por ejemplo a partir de una célula, medio de cultivo, organismo o productos de excreción del organismo.

Además, la presente invención se explicará con mayor detalle en las siguientes figuras y ejemplos:

Figura 1A: Análisis FACS de células K562 para la expresión de $\alpha 5$: La expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ humana sobre la superficie celular de células K562 vivas se demostró con el anticuerpo monoclonal IIA1 bloqueante de la función de la integrina $\alpha 5\beta 1$ de ratón (14). Para tal fin, se usaron procedimientos FACS estándar según se describe en el Manual de HuCAL® GOLD provisto por MorphoSys.

Figura 1B: La línea celular de carcinoma de colon humana HT29 no expresa la cadena de integrina $\alpha 5$.

El análisis FACS demostró que las células HT29 no expresan la cadena de integrina $\alpha 5$, en tanto la cadena $\beta 1$ está presente sobre la superficie celular a una gran densidad.

Por este motivo, las células HT29 son sumamente adecuadas para una transfección con la cadena de integrina $\alpha 5$.

Figura 1C: La línea celular de carcinoma de colon humana HT29 expresa la integrina $\alpha 5\beta 1$ después de una transfección con el ADNc de la integrina $\alpha 5$.

Después de una transfección con la cadena de integrina $\alpha 5$, se demostró una expresión homogénea de la integrina $\alpha 5\beta 1$ sobre la superficie de las células HT29 $\alpha 5$ mediante análisis FACS usando el anticuerpo monoclonal IIA1 bloqueante de la función de la integrina $\alpha 5\beta 1$ humana de ratón como referencia.

Figura 2: Inhibición de la adhesión de células K562 a placas de cultivo recubiertas con fibronectina

Se incubaron células K562 precargadas con calceína en presencia de anticuerpos monoclonales bloqueantes (IIA1) o no bloqueantes (VC5) de la función de la integrina $\alpha 5\beta 1$ de ratón. El antecedente de una unión independiente de integrinas de las células K562 a fibronectina se determinó usando EDTA 10 mM. El antecedente general del ensayo se determinó en cavidades bloqueadas con BSA que no permiten la adhesión de las células K562 a la superficie de las placas de cultivo. Las células adheridas (después de un lavado) se lisaron y se determinó la fluorescencia.

Figura 3: Inhibición dependiente de la dosis mediada por Fab de células K562 a fibronectina

Se evaluó el anti- $\alpha 5\beta 1$ humano específico de Fab por su capacidad para inhibir la unión de células K562 cargadas con colorante fluorescente a fibronectina inmovilizada. Después de la adhesión, las células se lisaron y se determinó la fluorescencia como una medida de las células que se adhirieron. La fibronectina sola indica una adhesión máxima, en tanto el antecedente general del ensayo se determinó sobre células recubiertas con BSA.

Figura 4: Anticuerpos bloqueantes de la función de $\alpha 5\beta 1$ inducen apoptosis en células endoteliales.

La inducción de la activación de caspasa 3/7 por el Fab purificado en el formato monovalente se determinó usando células HUVEC en medio para células endoteliales sin suero. La actividad caspasa se determinó usando un sistema de ensayo quimioluminiscente disponible comercialmente (Caspase Glo, PROMEGA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Figura 5: Competencia por FACS de Fab y IIA1

La competencia FACS indica que MOR04624 compite por el epítopo del anticuerpo de referencia IIA1 sobre células HT29 $\alpha 5$. Se puede concluir que ambos anticuerpos comparten un epítopo similar, en tanto los demás Fab reaccionan con sitios de unión no relacionadas sobre la integrina $\alpha 5\beta 1$. (línea negra: unión de Fab, línea verde: unión de Fab cuando se hace competir con el anticuerpo de referencia IIA1).

Figura 6: Anticuerpos bloqueantes de la función de $\alpha 5\beta 1$

madurados por afinidad inducen potentemente la apoptosis en células endoteliales

La inducción de la activación de caspasa 3/7 por el Fab purificado en el formato monovalente se determinó usando células HUVEC en medio para células endoteliales sin suero. La actividad caspasa se determinó usando un sistema de ensayo quimioluminiscente disponible comercialmente (Caspase Glo, PROMEGA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Figura 7: Anticuerpos Fab que bloquean la función de $\alpha 5 \beta 1$ madurados por afinidad inhiben la proliferación de células endoteliales

Se incubaron células HUVEC adherentes en medio para células endoteliales sin suero durante 48 horas en presencia de la cantidad indicada de Fab purificado o anticuerpo de referencia IIA1. Las células en proliferación se determinaron con un ensayo XTT disponible comercialmente de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se determinaron los valores de IC_{50} y se resumen en la Tabla 4.

Figura 8: IgG optimizadas en un ensayo de adhesión con HUVEC

La inhibición de la adhesión de células HUVEC a fibronectina por anticuerpos IgG bloqueantes de la función de $\alpha 5 \beta 1$. Las IgG MOR04974, MOR04975, MOR04977, MOR04985 bloquean la adhesión con una IC_{50} similar al IIA1. La conversión de Fab a IgG dio como resultado una mejora de aproxima-

damente el doble.

Figura 9: Ensayo de viabilidad de HUVEC: análisis de IgG anti-integrina $\alpha 5\beta 1$

La inhibición de la viabilidad de células HUVEC por anticuerpos IgG bloqueantes de la función de $\alpha 5\beta 1$. Las células HUVEC se plaquearon sobre placas recubiertas con fibronectina, se incubaron con concentraciones crecientes de anticuerpos IgG y se midió la sobrevivencia después de 48 hs. Las IgG MOR04974, MOR04975, MOR04977, MOR04985 bloquean la adhesión con una IC_{50} similar al IIA1. La conversión de Fab en IgG dio como resultado una mejora de aproximadamente el doble.

Figura 10: Ensayo con caspasa en HUVEC de IgG anti-integrina $\alpha 5\beta 1$

La inducción de la activación de caspasa 3/7 por los anticuerpos IgG bloqueantes de la función $\alpha 5\beta 1$ se determinó usando células HUVEC en medio para células endoteliales sin suero. La actividad de caspasa se determinó usando un sistema de ensayo quimioluminiscente disponible comercialmente (Caspase glo, PROMEGA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las MOR04974, MOR04975, MOR04977 y MOR04985 tienen una actividad similar al anticuerpo de referencia IIA1.

Figura 11: Fab madurado por afinidad precipita específicamente la integrina $\alpha 5\beta 1$ de lisados de superficies celulares biotiniladas

Se incubaron lisados de superficies biotiniladas NP40

de HT29 α 5 y HT29wt con Fab acoplado a esferas magnéticas Dyna. Los inmunoprecipitados fueron transferidos a membranas de PVDF y se analizaron con estreptavidina-fosfatasa alcalina (AP). Todos los Fab precipitaron específicamente a la proteína del tamaño esperado comparable al anticuerpo de referencia IIA1 fuera del lisado HT29 α 5, en tanto ninguna proteína era detectable en el lisado de HT29wt. El Fab MOR03207 irrelevante no precipitó específicamente ninguna proteína.

Figura 12: Especificidad de unión de la IgG anti-integrina α 5 β 1 (ejemplo MOR04974) con HT29-wt y HT29 α 5 (medición FACS)

Se incubaron anticuerpos IgG madurados por afinidad 10 μ g/ml con 5×10^5 células HT29wt y HT29 α 5. Los anticuerpos unidos específicamente fueron detectados con un anticuerpo secundario marcado con Cy3. Panel superior: IIA1 incubado con HT29wt (izquierda) o células HT29 α 5 (derecha), panel inferior: IgG1 MOR04974. El cambio de fluorescencia indica unión específica con la integrina α 5 y se observó para MOR04975, MOR04977, MOR04985 y MOR04624. Los controles de isotipo del anticuerpo son negativos (líneas negras). Los anticuerpos anti-integrina de la invención se unen a las células transfectadas con la cadena α 5 con la misma especificidad que el anticuerpo de referencia IIA1.

Figura 13: Unión competitiva de las IgG anti-integrina α 5 β 1 (ejemplo MOR04974) sobre células HT29 α 5 con IIA1 (medi-

ción con FACS). La IgG anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ compete con IIA1 por un epítopo superpuesto.

Se incubaron anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ de producción propia a 1 $\mu\text{g/ml}$ con 5×10^5 células HT29 $\alpha 5$ que se habían preincubado, o no, con IIA1 20 $\mu\text{g/ml}$. La presencia de la unión de IIA1 queda demostrada por la detección con FITC anti-ratón de cabra (panel de la izquierda). La unión y competencia del anticuerpo humano (MOR04974) se muestra por la detección con el anticuerpo secundario FITC anti-humano de cabra (panel de la derecha). Este ejemplo muestra la competencia para MOR04974. Se obtuvo el mismo resultado para MOR04975, MOR04977, MOR04985, MOR04624.

Figura 14: Análisis de los anticuerpos IgG1 anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ en el ensayo de formación de tubos (Ejemplo MOR04974). Los anticuerpos IgG1 anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ optimizados por afinidad bloquean la formación de tubos tan eficazmente como IIA1.

Se cosecharon células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC N° 2519) de pasaje temprano hasta 60-80% de confluencia y se inocularon 2×10^4 células sobre cavidades Matrigel (Becton Dickinson N° 354234) en medio EBM-2 (Clonetics N° CC3156). Los anticuerpos se agregaron 15 min después y se dejó que avanzara la formación de tubos durante 18-24 hs a 37 °C. A continuación, las células se fijaron (formalina 4%), se permeabilizaron, bloquearon y tiñeron con anti-

CD31. Los anticuerpos se aplicaron a concentraciones de 6 nM, 3 nM, 600 pM, 300 pM y 60 pM. Se muestran las imágenes representativas para el efecto a 300 pM **A:** muestra no tratada, **B:** IgG1 anti-lisozima MOR03207 humana, **C:** IgG1 MOR04624, **D:** IgG1 MOR04974, **E:** IIA1, **F:** IgG1 murina. También se encontró el mismo resultado para MOR04975 y MOR04977

Figura 15: Actividad de los anticuerpos IgG anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ optimizados por afinidad en el ensayo de migración Transwell.

El ensayo de migración se efectúa en una microplaca para migración Transwell de 96 cavidades (poros de 8 μ m, N° 351163 Falcon/BD), con fibronectina como único estímulo. El lado inferior de la membrana Fluoroblok se recubrió con fibronectina 2 μ g/ml por 1 h a 37 °C y se bloqueó con BSA 2% por 30 min a 37 °C. Se usó medio endotelial sin suero humano (Invitrogen) que contenía BSA 0,1% como solución amortiguadora de migración en la cámara superior e inferior. Se agregaron anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ (0,6-10 μ g/ml) a la cámara superior de cada cavidad, se agregaron HUVEC de pasaje temprano (2×10^4) y se dejó que avanzara la migración de células por 4 hs a 37 °C. Las células migradas sobre el lado inferior de las membranas se tiñeron luego con calceína y se determinó la fluorescencia resultante con un contador Perkin Elmer 1220 Victor a 485 nm de excitación y 535 nm de emisión.

A: Las imágenes que se muestran se obtuvieron a una concentración de anticuerpo 10 µg/ml. MOR04974, MOR04975, MOR04977 inhibieron la migración de HUVEC de manera tan eficaz como IIA1.

B: Dosis-respuesta de la actividad anti-migratoria de MOR04974, 75, 77 (isotipo del anticuerpo IgG4-Pro). IC₅₀ (MOR04974: 1 µg/ml, MOR04975: 1,5 µg/ml, MOR04977: 1 µg/ml, IIA1: 2 µg/ml)

Figura 16: Patrón de tinción IHC de anticuerpos IgG1 anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ optimizadas por afinidad en tejido de carcinoma de colon.

Aumento 10x, se titularon anticuerpos biotinilados sobre secciones de tejido en serie de carcinoma de colon. La detección se efectuó con estreptavidina-fosfatasa alcalina. A modo de ejemplo se muestran las secciones inmunohistoquímicas obtenidas con una concentración de 2,5 µg/ml. Para IIA1 y MOR04974, se observó coloración de vasos de tamaño pequeño a intermedio y del compartimiento estromático. Las flechas negras muestran los mismos vasos teñidos con ambos anticuerpos. Se encontró un patrón de coloración similar para MOR04975 y MOR04977. Las flechas azules indican los vasos teñidos. Se puede concluir que los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ optimizados muestran patrones de coloración comparables a IIA1.

Figura 17: Direccionamiento a tumores de los anticuer-

pos anti- $\alpha 5\beta 1$ integrina optimizados por afinidad (IgG4-Pro).

Los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ fueron marcados radioactivamente con iodo-125 (1 min, método Iodogen). Se determinó que la inmunorreactividad remanente era del 75-80% y se inyectaron 3 μ g de anticuerpo marcado en ratones desnudos con xenoinjertos de HT29 $\alpha 5$.

A: Captación por el tumor de IgG1 MOR04974, MOR04975 y controles (anticuerpo de referencia IIA1 y anti-lisozima MOR03207), B: Captación por el tumor de IgG1 MOR04977 y controles.

La captación de anticuerpos de los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ era similar a IIA1 y significativamente mayor en comparación con el IgG1 MOR03207 irrelevante. Los autores concluyen a partir de este resultado que los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ están dirigidos específicamente a los xenoinjertos de HT29 $\alpha 5$ positivos para la integrina $\alpha 5\beta 1$.

Figura 18: Análisis de los anticuerpos IgG optimizados anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ en el modelo de angiogénesis esferoide sustituto 3D in vivo.

Se implantaron cartuchos de Matrigel que contenían esferoides de un número definido de células endoteliales junto con VEGF y FGF2 por vía subcutánea en ratones SCID. Se analizó la gemación de EC y la formación vasos de una compleja red de la vasculatura de ratón después del tratamiento con los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ humanos optimizados y

anticuerpos control. Los anticuerpos IgG MOR04974 y MOR04975 humanos fueron tan eficaces como IIA1.

La invención se ilustra además con los ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos no deben considerarse como limitaciones.

Ejemplos

1. Generación de anticuerpos bloqueantes de la función de la integrina $\alpha 5 \beta 1$

1.1 Estrategias de estudio

El anticuerpo monoclonal IIA1 de ratón se une a un epítopo de conformación de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ que solamente está presente sobre células vivas activadas (endoteliales). Para abarcar tanto la selectividad como la actividad funcional, se estableció una vía de estudio compuesta por paneos alternados de antígenos aislados y células que expresan antígenos en combinación con ensayos de selección y examen basados en células funcionales para la identificación de los principales candidatos de anticuerpo derivados de HuCAL[®] GOLD en el formato Fab:

1. Selección de fragmentos de anticuerpo Fab de unión a anti-integrina $\alpha 5 \beta 1$ por expresión en fagos usando la biblioteca HuCAL[®]-Gold (MorphoSys). Los experimentos de paneo se efectuaron con antígenos aislados y células que expresan antígenos. Sobre la base de las secuencias de aminoácidos de los mejores clones de anticuerpo, se generaron sub-

bibliotecas por randomización de VL-CDR3 o VH-CDR2 usando secuencias de CDR humanas y a partir de las cuales se seleccionaron en experimentos de panning adicionales ligadores aún más avanzados. Se obtuvieron clones adicionales por clonación de combinaciones de cadenas livianas y pesadas que contienen las VL-CDR3 y VH-CDR2 de interés en una molécula de anticuerpo ("clonación-X").

2. Selección y examen de los anticuerpos Fab enriquecidos se efectuó de la siguiente manera. Los ligadores de todos los paneos fueron evaluados por su unión en ELISA sobre células positivas para la integrina $\alpha 5 \beta 1$ y negativas para la integrina $\alpha 3 \beta 1$. Los clones positivos según el ELISA fueron analizados además por la unión a células en experimentos FACS en células que sobreexpresan $\alpha 5$ y células negativas para $\alpha 5$. A continuación, se analizaron los clones adecuados en ensayos funcionales para i) adhesión celular a fibronectina ii) inducción de apoptosis de HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) y/o HDMVEC (células vasculares endoteliales dérmicas humanas) iii) medición de afinidad y ensayo de competencia por FACS con el anticuerpo de referencia IIA1 y iv) reactividad cruzada entre especies.

1.2 Generación de las herramientas y desarrollo del ensayo

ADNc de la cadena de integrina $\alpha 5$

El ADNc de la cadena $\alpha 5$ humana se obtuvo de RZPD (IMA-

GE-ID 6821577) y se clonó en el vector de expresión pADNc3 (INVITROGEN) de acuerdo con métodos estándar.

Receptores de integrina purificados

Los receptores de integrina $\alpha 5\beta 1$ (Chemicon CC1052) y $\alpha 3\beta 1$ (Chemicon CC1092) humanos solubilizados en detergente se obtuvieron de CHEMICON INTERNATIONAL (Temecula, CA, EE.UU.). Para los ensayos de expresión en fagos en fase sólida, ELISA y BiaCore, se seleccionaron lotes de integrina con una pureza de al menos 90% por SDS-PAGE no desnaturalizante.

Líneas celulares

La adhesión de la línea celular K562 de leucemia mielo-génica crónica humana (ATCC, N° Acceso: CCL-243) a fibronectina está mediada solamente por la integrina $\alpha 5\beta 1$ (16). Esta línea celular se usó en el ensayo de adhesión mediado por fibronectina para un examen funcional inicial. Se demostró la presencia de la integrina $\alpha 5\beta 1$ mediante análisis FACS usando el anticuerpo IIA1 para la detección (Figura 1A).

Un prerrequisito para de las estrategias de paneo diferencial de células es un sistema de modelos donde el blanco de interés es sobreexpresado sobre una línea celular que es negativa para el blanco. Para tal fin, los autores eligieron la línea celular de carcinoma de colon humana HT29 (ATCC, N° Acceso: HTB-38) que expresa la cadena de integrina $\beta 1$, pero no la cadena $\alpha 5$ (Figura 1B). El ADNc de la cadena $\alpha 5$ se

transfectó en las células progenitores HT29 usando lipofectamina de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se seleccionó un clon estable que sobreexpresaba $\alpha 5$ mediante examen por FACS usando el anticuerpo monoclonal IIA1 de ratón para marcar específicamente la integrina $\alpha 5\beta 1$ expresada en superficie (Figura 1C).

Ensayo de adhesión

Se estableció un ensayo de adhesión sensible para un examen funcional usando la línea celular K562 que sólo expresa la integrina $\alpha 5\beta 1$ humana. Para tal fin, se recubrieron placas de 96 cavidades con fibronectina humana o BSA 1 $\mu\text{g/ml}$ como sustrato no adhesivo para determinar el antecedente general del ensayo. Dado que la adhesión de integrinas a las moléculas ECM es dependiente de la presencia de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, se usó EDTA 10 mM para determinar la unión basal a fibronectina independiente de integrina. Se usó el anticuerpo IIA1 bloqueante de la función como referencia y un anticuerpo monoclonal anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ de ratón no bloqueante (VC5) sirvió como control de anticuerpo negativo. Según lo esperado, los recubrimientos con EDTA, IIA1 (5 $\mu\text{g/ml}$) y BSA inhibieron la unión de la adhesión mediada por K562, en tanto VC5 (5 $\mu\text{g/ml}$) no interfirió en la adhesión celular (Figura 2).

1.3 Expresión del anticuerpo en fagos y estrategias de paneo

La expresión de anticuerpos en fagos para la identifi-

cación de los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ completamente humanos se efectuó con una biblioteca HuCAL[®]-GOLD de acuerdo con los protocolos descritos en la literatura (17-20). Se aplicaron las siguientes estrategias de paneo y se corrieron en paralelo (Tabla 1):

Subcódigo de paneo	1ª ronda	2ª ronda	3ª ronda
1298.1-3	integrina $\alpha 5\beta 1$ en fase sólida	integrina $\alpha 5\beta 1$ en fase sólida	integrina $\alpha 5\beta 1$ en fase sólida
1298.4-6	integrina $\alpha 5\beta 1$ en fase sólida	Células K562	integrina $\alpha 5\beta 1$ en fase sólida
1299.1-3	Células K562	integrina $\alpha 5\beta 1$ en fase sólida	Células K562
1321.1-3	integrina $\alpha 5\beta 1$ en fase sólida	Células HT29 $\alpha 5$	integrina $\alpha 5\beta 1$ en fase sólida
1322.1-3	Células HT29 $\alpha 5$ p.a. HT29wt	integrina $\alpha 5\beta 1$ en fase sólida	Células HT29 $\alpha 5$
1322.4-6	Células HT29 $\alpha 5$ p.a. HT29wt	Células HT29 $\alpha 5$ p.a. HT29wt	Células HT29 $\alpha 5$
1324.1-3	HDMVEC	integrina $\alpha 5\beta 1$ en fase sólida	HDMVEC
1369.1-2	integrina $\alpha 5\beta 1$ en fase sólida	Células HT29 $\alpha 5$ p.a. HT29wt	integrina $\alpha 5\beta 1$ en fase sólida
1371.1-2	Células HT29 $\alpha 5$ p.a. HT29wt	integrina $\alpha 5\beta 1$ en fase sólida	Células HT29 $\alpha 5$ p.a. HT29wt

Tabla 1: Revisión de enfoques de paneo

p.a: post-adsorción con HT29wt (para reducir la unión no específica a la superficie celular)

Resultados:

Durante los paneos 1298-1324, se examinaron varios miles de clones. A pesar del hecho que se aplicaron diversas estrategias de expresión, se aisló repetidamente un clon (MOR04055) que era selectivo en ELISA y FACS. Además de MOR04055, que aparentemente se une a un epítopo inmunodominante, se identificaron 4 clones adicionales (MOR04139, 04141, 04160, 04568). Para incrementar aún más la probabilidad de seleccionar ligadores de integrina más diversos y específicos, se llevaron a cabo 2 paneos adicionales (1369.1-2 y 1371.1-2). En este caso, se agregó MOR04055-Fab 10 µg/ml durante la expresión en fagos con el fin de suprimir el enriquecimiento del clon dominante, MOR04055. A pesar de la competencia del Fab, todos los ligadores específicos hallados en todos los paneos 1369 eran nuevamente MOR04055. En los paneos 1371, se identificó un ligador individual adicional (MOR04624).

1.4 Pruebas funcionales con anticuerpos-Fab

Ensayo de adhesión

Los anticuerpos obtenidos con el enfoque del primer paneo fueron clasificados de acuerdo con su potencia bloqueante de la función en un experimento de selección y examen previos de la siguiente manera: MOR04624 > MOR04055 > MOR04141 = MOR04568 = MOR04160. MOR04139 era ligeramente inhibidor pero no alcanzó un 50% de inhibición. Los estudios dependientes de la dosis de los anticuerpos a diferentes

concentraciones en el ensayo de adhesión K562 confirmó el resultado del experimento de la selección y examen previos de los solicitantes con una excepción: MOR04139 no mostró ninguna inhibición dependiente de la dosis. Este anticuerpo no se investigó más (figura 3).

Inducción de apoptosis

Los anticuerpos obtenidos con el enfoque del primer panning fueron evaluados además por las propiedades de inducción de apoptosis. Por ello, se recubrieron placas de 96 cavidades con fibronectina 0,2 y 0,4 $\mu\text{g/ml}$ por 1 hora a 37 °C y se bloquearon con BSA 2%. Se incubaron 1×10^4 células HUVEC junto con el respectivo anticuerpo en medio de cultivo para células endoteliales sin suero (Gibco). Después de 18 horas, se usó un conjunto de elementos de ensayo de caspasa 3/7 para lisis celular y cuantificación de la actividad caspasa de acuerdo con el procedimiento descrito por el proveedor (Caspase Glo 3/7; Promega). A una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de Fab MOR04055 y 04624 monovalente indujo actividad caspasa 3/7 en células HUVEC tan fuertemente como el anticuerpo de referencia bivalente IgG IIA1 a 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 4). Los demás Fab fueron negativos en este ensayo.

Mediciones de la afinidad por titulación FACS

Para analizar la potencia de unión con la integrina $\alpha 5\beta 1$ nativa, se evaluaron todos los anticuerpos con células HUVEC positivas para $\alpha 5\beta 1$ por titulación FACS (Tabla 2).

MOR04055 mostró la afinidad de unión más alta (0,9 nM) y mostró un incremento en el formato de IgG dimérica. Para MOR04624 se encontró una KD en el rango nanomolar bajo para el Fab monovalente y un incremento en la KD para la IgG dimérica.

MOR	KD (nM) Fab monovalente	KD IgG
04055	0,9	0,5
04139	Ajuste no rel.	n.d.
04624	7,5	3,1
IgG IIA1	-	0,6/1,0

Tabla 2: Resultado de la determinación de la afinidad de Fab e IgG monovalentes por titulación FACS

Competencia FACS de Fab y IIA1

Para investigar si los anticuerpos Fab comparten, o no, el mismo epítopo con IIA1, se incubaron células HT29 α 5 ya sea con Fab 0,5 μ g/ml solo o junto con IIA1 10 μ g/ml. La unión de los Fab humanos con las células se detectó con anti-PE específico de Fab humano de cabra conjugado para los análisis FACS. En la Figura 7 se muestra una superposición de la tinción de Fab solamente (líneas negras) y Fab + IIA1 (líneas verdes). Como resultado de ello, la adición de IIA1 conduce a una clara disminución en la intensidad de la coloración por MOR04624. Todos los demás Fab no eran afectados por IIA1. Este resultado indica que IIA1 y MOR04624 compiten entre sí por la unión a un epítopo idéntico o superpuestos,

en tanto los otros 4 Fab se unen a epitopes no relacionados.

1.5 Maduración por afinidad: Análisis de anticuerpos Fab e IgG

Los Fabs MOR04055 y 04624 fueron sometidos a una ronda de maduración por afinidad. Por eso se construyeron subbibliotecas a partir del Fab progenitor ya sea por randomización de VL-CDR3 o VH-CDR2 (17) y luego fueron sometidas a selección por expresión en fagos con $\alpha 5\beta 1$ purificada y células HT29 $\alpha 5$. Los ligadores positivos de este examen fueron analizados adicionalmente en un ensayo de adhesión con células HT29 $\alpha 5$ y clasificados de acuerdo con su actividad inhibidora. Se encontró que el mejor potencial inhibidor era para los derivados de MOR04624. Los derivados de MOR04055, MOR04568, MOR04141 mostraron una mejora tan solo moderada o no significativa en la inhibición. Sobre la base de las cadenas liviana y pesada de estos clones se clonaron 12 nuevas combinaciones de VL-CDR3 y VH-CDR2 para su optimización adicional (la denominada "clonación X"). Se expresaron y se purificaron los mejores clones inhibidores y los clones de la clonación-X y se compararon *in vitro* de modo que eventualmente se identificaron 7 ligadores únicos consolidados con actividades mejoradas como bloqueantes de la función para un análisis más profundo adicional (MOR04971, 72, 74, 75, 77, 85, 87).

Inducción de apoptosis

La inducción con células HUVEC *in vitro* se midió por la actividad caspasa y la sobrevivencia celular (Figura 6 y Figura 7). En ambos ensayos, la eficacia de los Fab monovalentes MOR04974, 04975 y 04977 era comparable a la del anticuerpo de referencia monoclonal bivalente de ratón, IIA1.

	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (nM)
IIA1	0.05	0.3
MOR04624	11.25	225.0
MOR04985	0.09	1.8
MOR04987	0.12	2.4
MOR04977	0.09	1.9
MOR04975	0.09	1.8
MOR04974	0.06	1.2
MOR04055	1.87	37.3
MOR04971	0.21	4.3
MOR04972	0.67	13.3

Tabla 3: Valores IC₅₀ de los anticuerpos Fab en el ensayo de proliferación XTT

En comparación con el Fab progenitor, los anticuerpos madurados por afinidad eran significativamente mejores (hasta un factor de 190). La inhibición de la proliferación del Fab monovalente era 4 veces menos eficaz que la del anticuerpo de referencia bivalente, IIA1.

Inmunoprecipitación

Para demostrar la especificidad de los anticuerpos Fab, se incubaron lisados de superficie biotinilados NP-40 de cé-

lulas HT29 α 5 y HT29wt con Fab acoplados a esferas magnéticas Dyna. Se usó IIA1 como anticuerpo de referencia. Después de lavados exhaustivos, los precipitados se llevaron a ebullición en solución amortiguadora para muestras de SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, se transfirieron a membranas de PVDF y fueron sometidos a pruebas con sonda usando estreptavidina-AP. Todos los anticuerpos anti-integrina α 5 β 1 precipitaron específicamente una proteína banda doble de ~135 kDa que corresponde al peso molecular esperado de las cadenas α 5 y β 1 de la integrina (Figura 11) y no se encontró en el lisado de células HT29wt. Se encontró la misma banda doble con IIA1. El Fab MOR03207 irrelevante se usó como control negativo y no precipitó esta banda doble. Este resultado demuestra la gran especificidad de los anticuerpos Fab.

IgG optimizadas en el ensayo de adhesión con HUVEC

Para investigar si la potencia *in vitro* de los anticuerpos Fab descritos previamente mejora con el formato dimerico, los anticuerpos fueron convertidos en moléculas IgG1 completas de acuerdo con tecnologías estándar usando el conjunto de elementos para el Vector IgG MorphoSys HuCAL (MorphoSys AG, Munich; Alemania) y se analizaron en el ensayo de adhesión con HUVEC (Figura 8), en el ensayo de viabilidad con HUVEC (Figura 9) y en el ensayo de apoptosis con HUVEC (Figura 10) en comparación con el anticuerpo de referencia IIA1.

Más importante aún, se incluyó IIA1 en cada experimento como punto de referencia. En este sentido, la conversión de IgG de MOR04974, 75 y 77 dio como resultado IgG HuCAL con una IC₅₀ muy similar a la de IIA1, lo que indica que la conversión conducía verdaderamente a una mejora del doble en comparación con el formato con Fab monovalente.

IgG optimizadas en el ensayo de viabilidad con HUVEC

Se observó que después de la conversión de IgG, cinco ligadores mostraban una mejora del doble de los valores de IC₅₀ en comparación con el formato Fab. MOR04974, 75 y 77 mostraron una eficacia muy similar en la reducción de la viabilidad en HUVEC a la referencia IIA1 IgG.

IgG optimizadas en ensayo de apoptosis con HUVEC

A partir del análisis de las principales IgG en el ensayo con Caspasa 3.7 se pudo concluir que MOR04974, 75 y 77 indujeron una apoptosis tan bien como el anticuerpo de referencia IIA1.

1.6 Análisis profundo de anticuerpos IgG anti-integrina optimizados por afinidad

Especificidad de los anticuerpos anti-integrina optimizados por afinidad

Los anticuerpos madurados por afinidad del formato IgG1 fueron evaluados por su especificidad de unión mediante análisis FACS en células HT29wt vs. HT29 α 5. Las células HT29wt son α 5-negativas pero contienen la cadena β 1-integrina. Las

células HT29 α 5 pero no HT29wt son reconocidas específicamente por los anticuerpos IgG1 anti-integrina y el anticuerpo de referencia IIA1 según lo indica el cambio de fluorescencia. (Figura 12). Un anticuerpo control del isotipo no específico no se une a las células y no se observaron cambios en la fluorescencia medida. Estos experimentos muestran que los principales anticuerpos candidato reconocen específicamente a la integrina α 5 y se unen con la misma especificidad que el anticuerpo de referencia IIA1.

La especificidad del epítopo de anticuerpos anti-integrina α 5 β 1 es retenida después de la maduración por afinidad y reclonación en el formato IgG

Los autores han mostrado en experimentos FACS que el anticuerpo Fab MOR04624 y sus derivados compiten con el anticuerpo de referencia IIA1 para la unión a un epítopo superpuesto. Después de la conversión al formato IgG1, los anticuerpos anti-integrina α 5 β 1 fueron evaluados nuevamente por su unión competitiva con el IIA1. La unión de los anticuerpos IgG1 anti-integrina α 5 β 1 MOR04974, 75, 77, 85 y MOR04624 a células HT29 α 5 dio como resultado un cambio de fluorescencia que fue completamente inhibido cuando las células eran preincubadas con IIA1. Este resultado confirmó la competencia del epítopo de IIA1 y los anticuerpos IgG1 anti-integrina α 5 β 1 (Figura 13).

Análisis cualitativo de los anticuerpos IgG1 anti-integrina

$\alpha 5\beta 1$ en el ensayo de angiogénesis con formación de tubos.

El bloqueo de los vasos recientemente formados a partir de células endoteliales activadas es considerado una de las actividades inhibidoras clave de los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$. Para una caracterización completa, los autores analizaron los anticuerpos IgG1 anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ optimizadas por afinidad en comparación con el anticuerpo de referencia IIA1 en una ensayo de formación de tubos con HUVEC.

En este ensayo, se sembraron 2×10^4 células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, N° 2519, Promocell) sobre Matrigel rico en factores de crecimiento (Becton Dickinson, N° 354234) en medio EBM-2 (Clonetics, N° CC3156). Los anticuerpos (6 nM, 3 nM, 600 pM, 300 pM, 60 pM) se agregaron 15 min después y se permitió la formación de tubos por 18-24 hs a 37 °C. A continuación, las células se fijaron y se tiñeron con anti-CD31 para la documentación fotográfica de la formación de tubos.

El análisis visual de las complejas redes formadas en las cavidades reveló una actividad bloqueante de la formación de tubos para todos los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ integrina derivados de MOR04624 con una potencia similar a la del anticuerpo de referencia (Figura 14). A concentraciones más altas, el bloqueo por anticuerpos de la formación de tubos también se observó para los controles de isotipo IgG1 humanos y murinos. Sin embargo, a concentraciones inferiores de

anticuerpo (tan bajas como 300 pM) se observó una ventana de actividad donde la formación de tubos solamente era bloqueada en las cavidades tratadas con anticuerpo específico pero no en las cavidades no tratadas o en las cavidades tratadas con el control de isotipo del anticuerpo o con el anticuerpo de débil función bloqueante, MOR04624.

Análisis de los anticuerpos IgG anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ en el ensayo de migración

Durante el proceso angiogénico, las células endoteliales activadas migran hacia un estímulo angiogénico sobre una matriz provisional específica de la angiogénesis que consiste principalmente de fibronectina (FN). Los autores analizaron los anticuerpos IgG anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ optimizados en el ensayo de migración Transwell y observaron una actividad bloqueante de la migración de HUVEC dependiente de $\alpha 5\beta 1$ -fibronectina para todos los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ con una eficacia en el mismo orden de magnitud (1-10 $\mu\text{g/ml}$) que el IIA1 (Figura 15).

Reactividad de los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$

Reactividad en líneas tumorales y de células endoteliales

Se evaluó la reactividad de los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ en diversas líneas de células endoteliales y tumorales mediante experimentos de unión FACS (tabla 4). Se observó unión a todas las líneas de células endoteliales y tumorales evaluadas, excepto las células HT29wt que son co-

nocidas por ser negativas para la cadena $\alpha 5$. En comparación con el anticuerpo de referencia IIA1, los principales anticuerpos candidato se unieron igualmente bien a todas las líneas celulares evaluadas y el cambio resultante en la fluorescencia era similar para todos los anticuerpos. Los anticuerpos de control del isotipo no se unieron. En resumen, los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ muestran una reactividad equivalente a IIA1 en los experimentos de unión de células FACS.

Línea celular	Tejido	anti- $\alpha v \beta 3$	anti- $\alpha v \beta 5$	anti- $\alpha 5 \beta 1$ *						
				VC5	IIA1	MOR04974	MOR04975	MOR04977	MOR04985	MOR04624
HDMVEC	células microvasculares endoteliales dérmicas humanas	+	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
HMEC	Epitelio mamario humano				+++	+++				
HPAEC	Endotelio de la arteria pulmonar humana				+++	+++				
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana	++	+	+++	+++	+++				
MS-1	Endotelio de páncreas de ratón				-	-				
PAEC	Células de endotelio de aorta de cerdo	-	+	+++	-	-				
hTumorend	Endotelio tumoral humano				++	+++	+++	+++	+++	+++
A375	Melanoma maligno				+	++	++	++	+/-	+
A549	Carcinoma de pulmón humano				++	+++	+++	+++	+++	++
Colo205	Adenocarcinoma humano	-	-	++	++	++	++	++	++	++
DU145	Carcinoma de próstata humano				+++	+++	+++	+++	+++	+++
HCT 116	Carcinoma colorrectal				+	++	++	++	+/-	+
HT-1080	Fibrosarcoma				++	+++	+++	+++	+	+++
MCF-7	Carcinoma de mama humano	+/-	++	+	+	+	+	+	+	+
MDA-MB-231	Carcinoma mamario humano	++	++	+++	++/+++	++	++	++	+	++
PC-3	Adenocarcinoma de próstata humano	+	+	++	++					
U251	Glioblastoma humano	+	+	++	++	++	++	++	++	++
HT29	Adenocarcinoma humano	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-
HT29 $\alpha 5$	HT29 transfectadas con la cadena $\alpha 5$				+++	+++	+++	+++	+++	+++

Tabla 4: Reactividad según FACS de los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5 \beta 1$ con diversas líneas celulares. + = cambio débil, ++ = cambio fuerte (fluorescencia 1 log), +++ = cambio muy fuerte (fluorescencia 2 log); controles de anticuerpo *mIgG1 y huIgG1, se usaron como controles estándar y la unión era negativa; material de anticuerpo: anti-CD51/61 human Chemicon N° CBL 544, anti- $\alpha v \beta 5$ Chemicon N° Mab 20192, anticuerpo VC5 no bloqueante de la función de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ Pharmingen N° 555650, anticuerpo IIA1 anti-integrina $\alpha 5 \beta 1$ Pharmingen N° 55561

Reactividad de anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ en secciones de tejido normal y tumoral: inmunohistoquímica

Los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ optimizados por afinidad fueron analizados en experimentos de inmunohistoquímica con diferentes secciones de tejido y el perfil de reactividad específico de los anticuerpos anti-integrina en los respectivos tejidos era muy parecido a la tinción de IIA1. En resumen, los autores concluyen que los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ de la invención muestran patrones de coloración comparables a IIA1 (figura 16).

Caracterización *in vivo* de los anticuerpos IgG anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ optimizados por afinidad

Demostración del reconocimiento dirigido *in vivo* en ratones desnudos con xenoinjertos

Se compararon las propiedades de reconocimiento dirigido *in vivo* de los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ optimizados en comparación con IIA1 en ratones desnudos que portaban xenoinjertos de células HT29 $\alpha 5$.

La marcación radioactiva de los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ optimizados (IgG4-Pro) se efectuó con iodo-125 de acuerdo con el método Iodogen por 1 min de acuerdo con procedimientos estándar. La inmunorreactividad se midió en un ensayo de unión celular ("ensayo Lindmo"). Se incubaron 50 ng de anticuerpo marcado radioactivamente con números crecientes (0,25 a 10 mill.) de células positivas para la

integrina $\alpha 5\beta 1$ durante 2 hs a 4°C. A continuación, se lavaron las células y se determinó la radioactividad unida con un contador de centelleo. Se graficó el cociente de cuentas totales/cuentas unidas contra 1/número de células y los datos se ajustaron usando un modelo de regresión no lineal. A partir de la intersección con el eje y se calculó la inmunoreactividad restante para una densidad de antígeno infinito, y se encontró que era del 75-80% para todos los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$.

Los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ humanos se acumularon dentro de las 24 horas en los xenoinjertos HT29 $\alpha 5$, con > 10% de ID/g que duraba 96 horas para todos los anticuerpos analizados, excepto MOR04975 que disminuyó rápidamente después de 48 horas a menos que un 5% ID/g después de 72 hs. MOR04974 alcanzó su valor pico después de 48 horas, con un 18% de ID/g, y MOR04977 después de 72 hs con un 18% de ID/g. En comparación, el anticuerpo IIA1 murino se acumuló dentro de las 24 hs en los xenoinjertos de HT29 $\alpha 5$ con > 10% de ID/g que duraba hasta 96 hs. Para el anticuerpo anti-lisozima no específico MOR03207 se observó menos que un 3% de ID/g en cualquier tiempo. A partir de estos resultados, se puede concluir un reconocimiento dirigido específico de los xenoinjertos de HT29 $\alpha 5$ positivos para $\alpha 5\beta 1$. El reconocimiento dirigido *in vivo* de los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ MOR04974 y MOR04977 es similar a IIA1 y en tiempos puntuales

es aún superior.

Eficacia *in vivo* de los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ en modelos de animales de angiogénesis sustitutos

Al igual que el anticuerpo de referencia IIA1, los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ no presentan reactividad cruzada con la integrina $\alpha 5\beta 1$ de ratón y rata. Por ello es difícil el análisis de la eficacia terapéutica *in vivo* y la demostración del efecto antiangiogénico específico *in vivo* en modelos de animales y debe efectuarse en modelos de angiogénesis sustitutos.

La comparación *in vivo* de los anticuerpos IgG anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ con IIA1 se efectuó en el modelo de angiogénesis esferoide sustituto 3D *in vivo* (figura 18).

Para este modelo, se mezclaron esferoides de un número definido de células endoteliales con colágeno que se dejó polimerizar en una placa de 24 cavidades. Los esferoides de EC en cartuchos de Matrigel que contienen VEGF y FGF2 fueron implantados luego por vía subcutánea en ratones SCID, donde las EC estimuladas formaron una compleja red tridimensional de capilares humanos que se anastomosaron con la vasculatura del ratón. Los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ (200 μ g) fueron administrados dos veces por semana durante tres semanas. El estudio terminó el día 21, se retiraron los cartuchos de Matrigel y se examinó en ellos la densidad de vasos sanguíneos. El tratamiento del anticuerpo de referencia IIA1 con

los anticuerpos IgG anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ optimizados MOR04974 y MOR04975 redujo la densidad microvascular en los cartuchos de Matrigel en un factor de dos.hasta 20 microvasos aproximadamente por mm^2 , en tanto el tratamiento con el anticuerpo anti-lisozima humano irrelevante MOR03277 dio como resultado 40 microvasos aproximadamente por mm^2 . Sobre la base de este resultado se puede concluir que los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ humanos optimizados MOR04974 y MOR04975 tienen una eficacia anti-angiogénica *in vivo* comparable a IIA1 en el modelo de angiogénesis esferoide sustituto 3D *in vivo*.

Conclusión:

En los experimentos *in vitro* las mejores propiedades inhibitoras en los formatos Fab así como IgG1 se observaron consistentemente para MOR4974, 75, 77. Las tres IgG son comparables al mAb de referencia IIA1. Estos ligadores son derivados de MOR04624.

En los experimentos *in vivo*, se demostró que las IgG completamente humanas y optimizadas MOR04974, 75, 77 son dirigidas eficazmente a los xenoinjertos tumorales en ratones desnudos y en el modelo de angiogénesis con esferoides 3D, MOR04974 y MOR04975 fueron tan eficaces como el anticuerpo de referencia IIA1.

Las secuencias de aminoácidos de las cadenas V de los anticuerpos anteriores se muestran en la Tabla 4:

MOR04624 progenitor

hIgG1 kappa final	Vector-VH-h-IgG1	Vector-VL-h-kappa
MOR04974	MOR04985	MOR04990
MOR04975	MOR04985	MOR04991
MOR04977	MOR04987	MOR04989
MOR04985	MOR04985	MOR04624

MOR04624

VLK (SEQ ID N°: 1)

diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapklliyaasnlqsgpsr
fsgsgsgtdftltisslqpedfavyyccqysdqsytfgggtkveikrt

VH (SEQ ID N°: 2)

qvqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssygmwvrqapgkglewvssisysdsntyy
adsvkgrftisrdnsknltlylqmnsdraedtavyycargldyghhhglsigifdywgqgt
lvtvss

MOR04055

VLA3 (SEQ ID N°: 3)

dieltqppsvsvapggqtariscsgdsigeqyahwyqqkpgqapvlviyddnkrpsgi-
perfsgnsngntatltisgtqaedeaddyccsytltnntasvfgggtkltvlg

VH3 (SEQ ID N°: 4)

qvqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsnyamnwvrqapgkglewvsrisysgsdtyy
adsvkgrftisrdnsknltlylqmnsdraedtavyycaregefgfmystlvfdswgqgtlv
tvss

MOR04971

VLA3 (SEQ ID N°: 5)

dieltqppsvsvapggqtariscsgdsigeqyahwyqqkpgqapvlviyddnkrpsgi-
perfsgnsngntatltisgtqaedeaddyccsytyssdasvfgggtkltvlg

VH3 (SEQ ID N°: 6)

qvqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsnyamnwvrqapgkglewv-
saihdnghtyypdsvkgrftisrdnskntlylqmnsdraedtavyycaregefgfmystl
vfdswgqgtltvtvss

MOR04974

VLk (SEQ ID N°: 7)

diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapklliyaasnlqsgpsr
fsgsgsgtdftltisslqpedfatyyccqyasprqtfgqgkveikrt

VH (SEQ ID N°: 8)

qvqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssygmswvrqapgkglewvsgirakqsgyat
dyaapvkgrftisrdnskntlylqmnsdraedtavyycarglgdyghhhglsgifdywgq
gtltvtvss

MOR04975

VLk (SEQ ID N°: 9)

diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapklliyaasnlqsgpsr
fsgsgsgtdftltisslqpedfatyyccqyefgiqtfgqgkveikrt

VH (SEQ ID N°: 10)

qvqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssygmswvrqapgkglewvsgirakqsgyat
dyaapvkgrftisrdnskntlylqmnsdraedtavyycarglgdyghhhglsgifdywgq
gtltvtvss

MOR04977

VLk (SEQ ID N°: 11)

diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapklliyaasnlqsgpsr
fsgsgsgtdftltisslqpedfatyyccqyssnpqtfgqgkveikrt

VH (SEQ ID N°: 12)

qvqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssygmswvrqapgkglewvsfiepkwrggat
 hayaasvkgrftisrdnsknltlylqmnsraedtavyycarglgdyghhghlsgifdywgq
 gtlvtvss

MOR04985

VLK (SEQ ID N°: 13)

diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapklli-
 yaasnlgsgpsrfsqsgsgtdftltisslqpedfavyyccqysdqsytfqggtkveikrt
 VH (SEQ ID N°: 14)

qvqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssygmswvrqapgkglewvsgrakqsgyat
 dyaapvkgrftisrdnsknltlylqmnsraedtavyycarglgdyghhghlsgifdywgq
 gtlvtvss

2. Conclusión:

Los anticuerpos bloqueantes de la función de la integrina $\alpha 5\beta 1$ solamente han estado disponibles en un formato de anticuerpos quiméricos. Los enfoques de una humanización completa han fracasado. La aplicación de tales anticuerpos en el ensayo clínico puede inducir una respuesta inmune en pacientes humanos. Especialmente para un compuesto anti-angiogénico aplicado crónicamente esto puede conducir a una mayor dosificación o aún a efectos secundarios severos que pueden llevar a una terminación temprana del tratamiento.

Los autores han identificado anticuerpos bloqueantes de la función de la integrina $\alpha 5\beta 1$ completamente humanos con un excelente perfil biológico. Es ventajoso para los anticuerpos murinos y quiméricos existentes debido a su naturaleza

completamente humana que garantizará la ausencia de efectos secundarios en los ensayos clínicos en tanto sea posible. Se espera que la probabilidad de inducir una respuesta inmune contra esta molécula con efectos secundarios severos y de mayores dosis sea mucho menor. Por ello es que estas moléculas son mucho más adecuadas para su aplicación en la medicina humana, por ejemplo para el tratamiento de tumores sólidos.

Referencias:

- 1) Carmeliet P y Jain RK (2000) *Nature* 407: 249-257
- 2) Kim S et al. (2002) *J Clin Invest* 110: 933-941
- 3) Kim S et al. (2002) *Am J Pathol* 156: 1345-1362
- 4) Kim S et al. (2002) *J Biol Chem* 275: 33920-33928
- 5) Cheresh DA y Stupack DG (2002) *Nat Med* 8: 193-194
- 6) George EL et al. (1993) *Development* 119: 1079-1091
- 7) George EL et al. (1997) *Blood* 90: 3073-3081
- 8) Yang et al. (1993) *Development* 119: 1093-1105
- 9) Goh KL et al. (1997) *Development* 124: 4309-4319
- 10) Taverna D y Hynes RO (2001) *Cancer Res* 61: 5255-5261
- 11) Francis SE et al. (2002) *Artheroscler Thromb Vasc Biol* 22: 927-933
- 12) McDonald D y Choyke PL (2003) *Nat Med* 9: 713-725
- 13) Bakre MM et al. (2002) *Nat Med* 8: 995-1003
- 14) Finck B (2004), Conferencia SRI „Angiogenesis: New Opportunities And Solutions For Drug Development“, Cam-

bridge, MA

- 15) Symington BE (1989) *J Biol Chem* 264: 13258-13266
- 16) Knappik A et al. (2000) *J Mol Biol* 296: 57-86
- 17) Krebs B et al. (2001) *J Immunol Methods* 254: 67-84
- 18) Rauchenberger R et al. (2003) *J Biol Chem* 278: 38194-38205
- 19) Lohning C, Patente de los EE.UU. N°: 6.753.136
- 20) Magnussen et al. (2005) *Cancer Research* 65: 2712-2721
- 21) Yao et al. (2006) *Cancer Research* 66: 2639-2649.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft

<120> ANTICUERPOS BLOQUEANTES DE LA FUNCIÓN DE LA INTEGRINA A5B1 HUMANOS Y HUMANIZADOS DE GRAN AFINIDAD CON INMUNOGENICIDAD REDUCIDA

<130> 53407AWO

<150> EP06010779.4

<151> 2006-05-24

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(108)

<223> VLk

<400> 1

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Gln Ser Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(126)

<223> VH

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Tyr Ser Asp Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Leu Gly Asp Tyr Gly His His His Gly Leu Ser Gly Ile
 100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 3

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(109)

<223> VLlambd3

<400> 3

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Glu Gln Tyr Ala
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Tyr Thr Leu Thr Asn Thr Ala
85 90 95

Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 4

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(124)

<223> VH3

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

42

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Glu Phe Gly Phe Met Tyr Ser Thr Leu Val Phe Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1) . . (109)

<223> VL1lambda3

<400> 5

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Glu Gln Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Tyr Ser Ser Asp Ala
85 90 95

Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 6

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1) .. (123)

<223> VH3

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile His Asp Asn Gly His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Gly Glu Phe Gly Phe Met Tyr Ser Thr Leu Val Phe Asp Ser

100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 7
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1)..(108)
 <223> VLk
 <400> 7
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ser Pro Arg Gln Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 8
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1) .. (128)
 <223> VH

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Arg Ala Lys Gln Ser Gly Tyr Ala Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Gly Asp Tyr Gly His His His Gly Leu Ser
 100 105 110

Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(108)

<223> VLk

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Phe Gly Ile Gln Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 10

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1) .. (128)

<223> VH

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Arg Ala Lys Gln Ser Gly Tyr Ala Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Gly Asp Tyr Gly His His His Gly Leu Ser
 100 105 110

Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(108)

<223> VLk

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Asn Pro Gln Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 12

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(128)

<223> VH

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Phe Ile Glu Pro Lys Trp Arg Gly Gly Ala Thr His Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Gly Asp Tyr Gly His His His Gly Leu Ser
100 105 110

Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 13

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(108)

<223> VLk

<400> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Gln Ser Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 14

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(128)

<223> VH

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

2

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano o humanizado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une a la integrina $\alpha 5\beta 1$ con una afinidad ≤ 100 nM y que inhibe la adhesión de las células que expresan integrina $\alpha 5\beta 1$ a su receptor *in vitro* e *in vivo*.

2. El anticuerpo, o fragmento de la reivindicación 1, que se une a la integrina $\alpha 5\beta 1$ con una afinidad ≤ 10 nM.

3. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de la reivindicación 1 ó 2, que inhibe la adhesión de la línea celular K562 *in vitro*.

4. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:

(a) una región VH seleccionada entre

(i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 (MOR04624), SEQ ID N°: 3 (MOR04055) o al menos una región H-CDR1, H-CDR2 y/o H-CDR3 de una de dichas regiones VH, o

(ii) una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de (i) por alteración de al menos una región H-CDR y/o

(b) una región VL seleccionada entre

(i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2 (MOR04624), SEQ ID N°: 4 (MOR04055) o al menos una región L-CDR1, L-CDR2 y/o L-CDR3 de una de dichas

regiones VL o

- (ii) una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de (i) por alteración de al menos una región L-CDR.

5. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de la reivindicación 4, que comprende una región VH derivada de una región VH de (a) (i) por randomización de la región H-CDR2.

6. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de la reivindicación 4 ó 5, que comprende una región VL derivada de una región VL de (b) (i) por randomización de la región L-CDR3.

7. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende una región VH- y/o VL derivada de una región VH de (a) (i) y/o de una región VL de (b) (i) por entremezclado de las cadenas de anticuerpo.

8. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que comprende

- (a) una región VH seleccionada entre las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID N°: 5 (MOR04971), SEQ ID N°: 7 (MOR04974), SEQ ID N°: 9 (MOR04975), SEQ ID N°: 11 (MOR04977) y SEQ ID NO. 11 (MOR04985), o al menos una región H-CDR1, H-CDR2 y/o H-CDR3 de dichas regiones VH, y/o

(b) una región VL seleccionada entre las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6 (MOR04971), SEQ ID N°: 8 (MOR04974), SEQ ID N°: 10 (MOR04975), SEQ ID N°: 12 (MOR04977) y SEQ ID N°: 14 (MOR04985), o al menos una región L-CDR1, L-CDR2 y/o L-CDR3 de dichas regiones VL.

9. Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende la región VH de la SEQ ID N°: 1 y la región VL de la SEQ ID N°: 2 (MOR04624) o al menos una región H-CDR1, H-CDR-2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3 de la misma.

10. Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende la región VH de la SEQ ID N°: 3 y la región VL de la SEQ ID N°: 4 (MOR04055) o al menos una región H-CDR1, H-CDR-2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3 de la misma.

11. Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende la región VH de la SEQ ID N°: 5 y la región VL de la SEQ ID N°: 6 (MOR04971) o al menos una región H-CDR1, H-CDR-2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3 de la misma.

12. Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende la región VH de la SEQ ID N°: 7 y la región VL de la SEQ ID N°: 8 (MOR04974) o al menos una región H-CDR1, H-CDR-2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3 de la misma.

13. Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende la región VH de la SEQ ID N°: 9 y la región VL de la SEQ ID N°: 10 (MOR04975) o al menos una región H-CDR1, H-CDR-2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3 de la misma.

14. Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende la región VH de la SEQ ID N°: 11 y la región VL de la SEQ ID N°: 12 (MOR04977) o al menos una región H-CDR1, H-CDR-2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3 de la misma.

15. Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que comprende la región VH de la SEQ ID N°: 13 y la región VL de la SEQ ID N°: 14 (MOR04985) o al menos una región H-CDR1, H-CDR-2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3 de la misma.

16. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que es un anticuerpo IgG, por ejemplo un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano o humanizado, o un fragmento del mismo, por ejemplo un fragmento Fab, Fab' o F(ab)₂.

17. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que es un anticuerpo recombinante, por ejemplo una anticuerpo de cadena simple (sc), o un fragmento del mismo, por ejemplo un fragmento sc Fv.

18. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 en la forma de un conjugado con un agente terapéutico.

19. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de la reivindicación 18, en donde el agente terapéutico se selecciona entre agentes radioterapéuticos y agentes quimioterapéuticos.

20. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de la reivindicación 19, en donde el agente radioterapéutico es I^{125} , I^{131} o Y^{90} .

21. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 en la forma de un polipéptido de fusión.

22. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de la reivindicación 21 como un polipéptido de fusión con una citoquina o como un anticuerpo biespecífico.

23. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 en la forma de un conjugado con un grupo de marcación detectable.

24. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de la reivindicación 23, en donde el grupo de marcación detectable se selecciona entre grupos de marcación radioactivos, NMR, colorantes, enzimas y fluorescentes.

25. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de la reivindicación 24, en donde el grupo de marcación radioactivo detectable se selecciona entre I^{125} , I^{131} o Y^{90} .

26. Una composición farmacéutica que comprende como agente activo un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.

27. La composición de la reivindicación 26, para la prevención o el tratamiento de trastornos hiperproliferativos.

28. La composición de la reivindicación 26 ó 27, para la prevención o el tratamiento de cáncer.

29. La composición de la reivindicación 26 ó 27, para la prevención o el tratamiento de carcinoma de colon.

30. La composición de la reivindicación 26 ó 27, para la prevención o el tratamiento de tumores.

31. Una composición de diagnóstico que comprende como reactivo de diagnóstico un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 o 23-24.

32. La composición de la reivindicación 32, para el diagnóstico de trastornos hiperproliferativos o de una predisposición a los mismos.

33. La composición de la reivindicación 32, para el diagnóstico de cáncer o una predisposición al mismo.

34. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 33, para su uso en medicina humana.

35. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 21 a 22.

36. El ácido nucleico de la reivindicación 35, que está ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión.

37. Un vector, o sistema de vectores, que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 35 ó 37.

38. Una célula que es transformada con el ácido nucleico de la reivindicación 35 ó 36 o con un vector de la reivindicación 37.

39. Un organismo no humano que es transformado con el ácido nucleico de la reivindicación 35 ó 36 o con un vector de la reivindicación 37.

40. Un método para preparar el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 ó 21-22, en donde la célula de la reivindicación 38 o el organismo no humano de la reivindicación 39 se cultiva bajo condiciones que permiten la expresión del polipéptido y se recupera el polipéptido expresado.

41. Uso de un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de trastornos asociados con la integrina $\alpha 5\beta 1$, o una predisposición a los mismos.

42. El uso de la reivindicación 41 para elaborar un medicamento para la prevención o el tratamiento de cáncer.

43. Uso de un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 para elaborar un reactivo para el diagnóstico de los trastornos asociados con la integrina $\alpha 5\beta 1$ o una predisposición a los mismos.

44. El uso de la reivindicación 43 para elaborar un reactivo para el diagnóstico de cáncer.

**ANTICUERPOS BLOQUEANTES DE LA FUNCIÓN DE LA INTEGRINA $\alpha 5 \beta 1$
HUMANOS Y HUMANIZADOS DE GRAN AFINIDAD CON INMUNOGENICIDAD
REDUCIDA**

RESUMEN

Polipéptidos recombinantes humanos o humanizados que se unen a la integrina $\alpha 5 \beta 1$ con gran afinidad y bloquean su función. Además, se describen aplicaciones de diagnóstico y farmacéutico de los polipéptidos.

FIGURA 1A

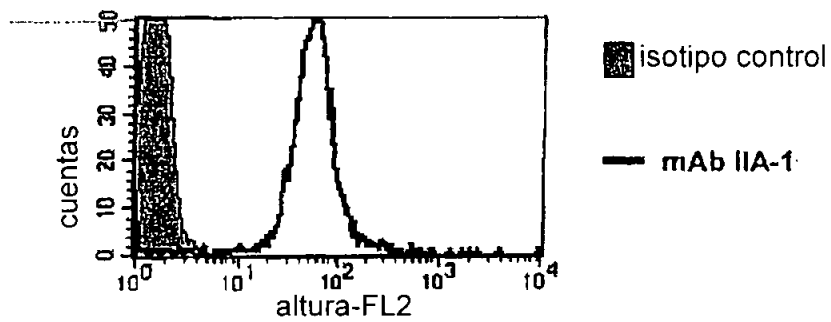


FIGURA 1B

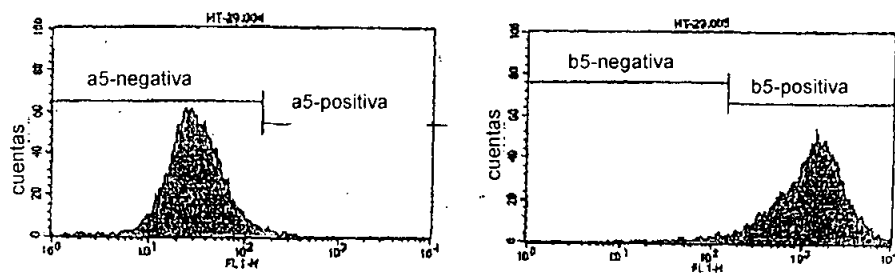


FIGURA 1C

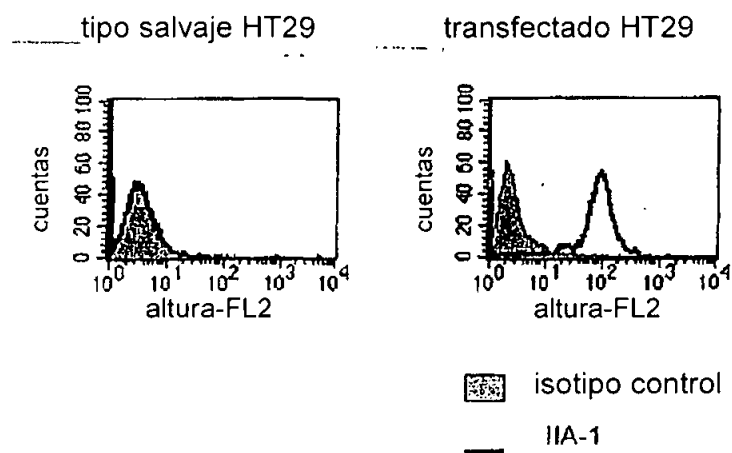


FIGURA 2

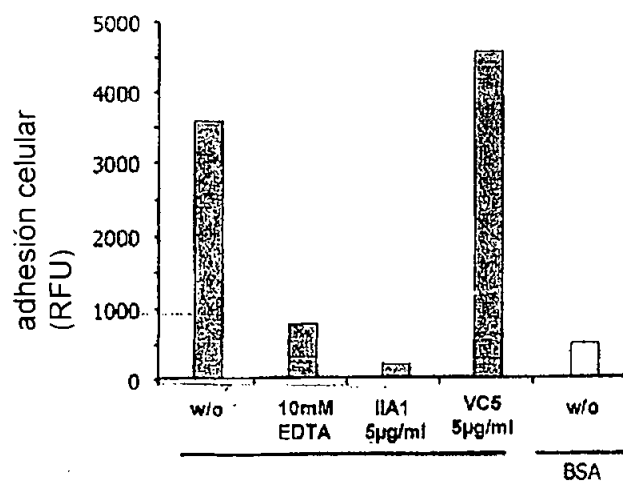


FIGURA 3

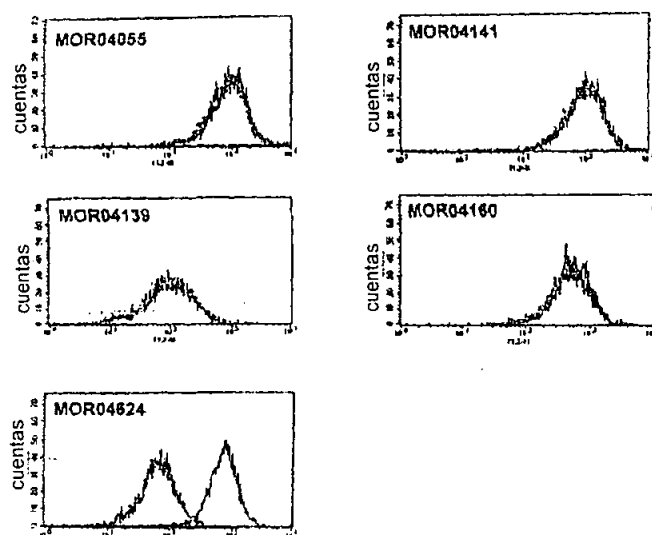


FIGURA 5

FIGURA 6

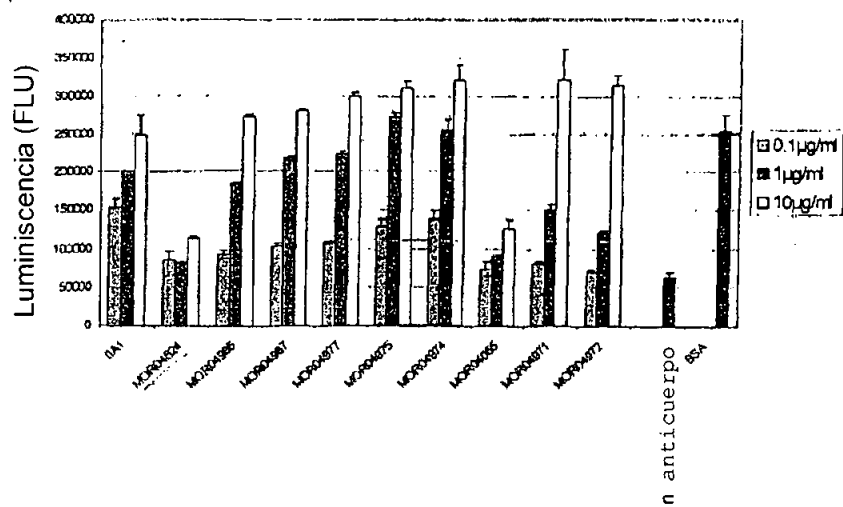


FIGURA 7

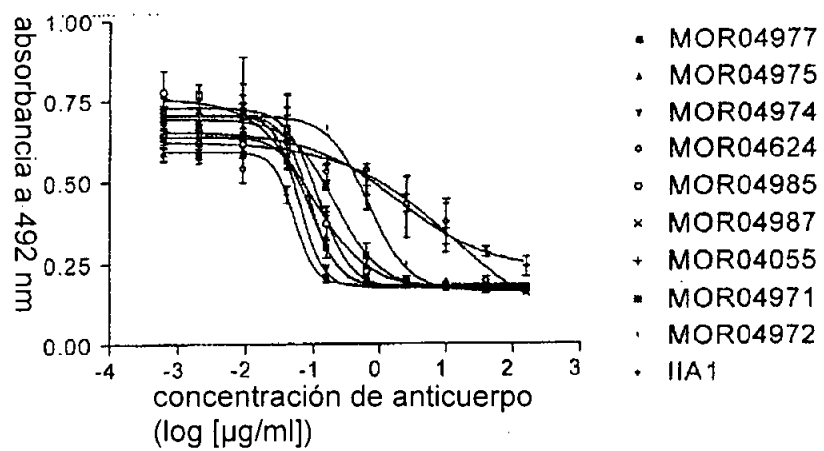


FIGURA 8

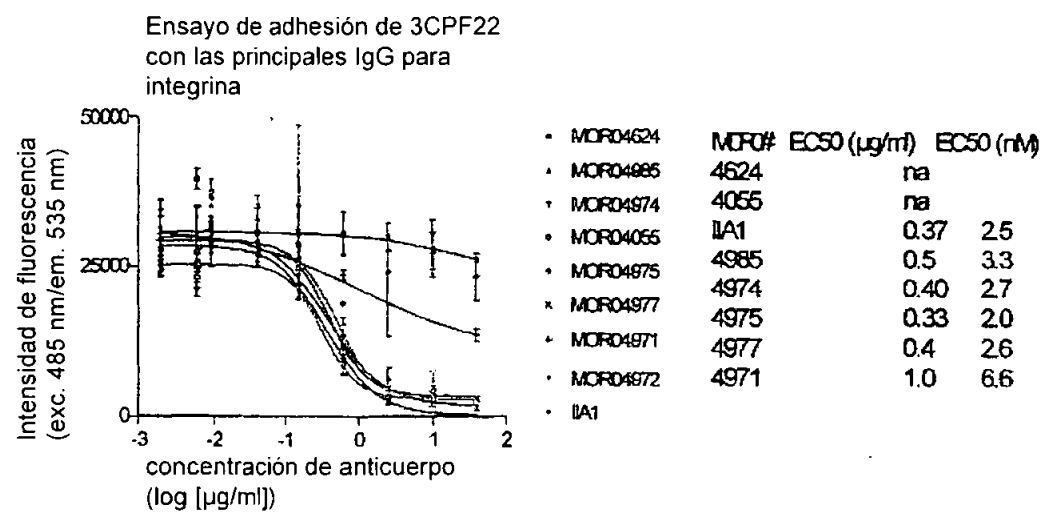


FIGURA 9

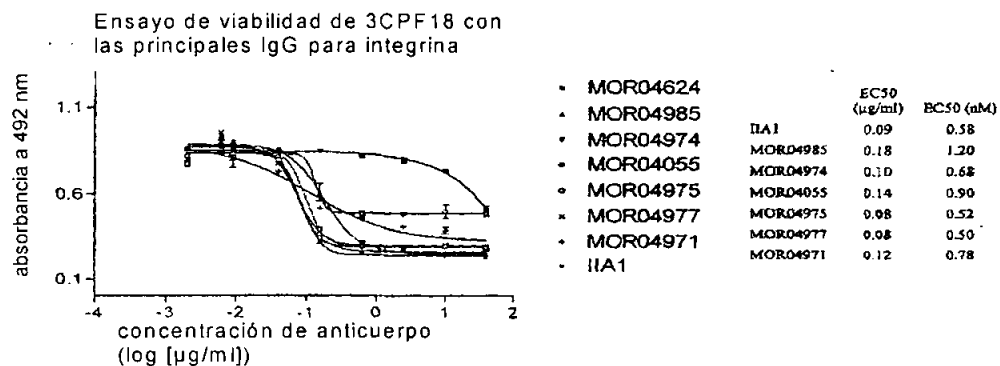


FIGURA 10

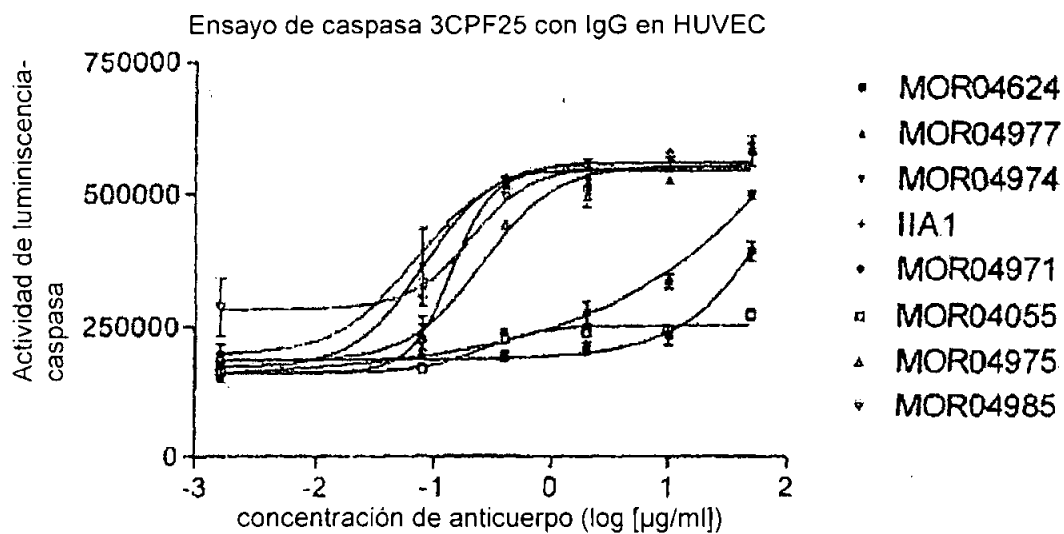


FIGURA 11

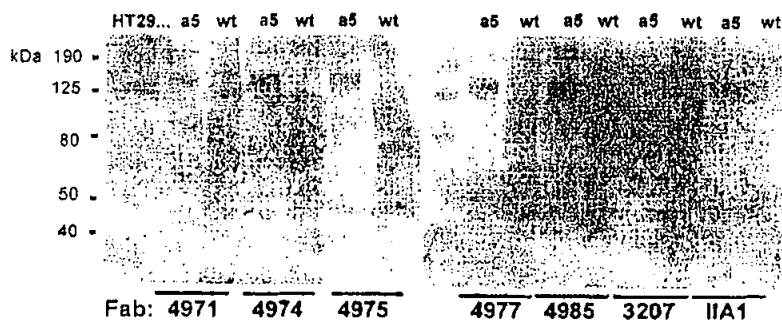


FIGURA 12

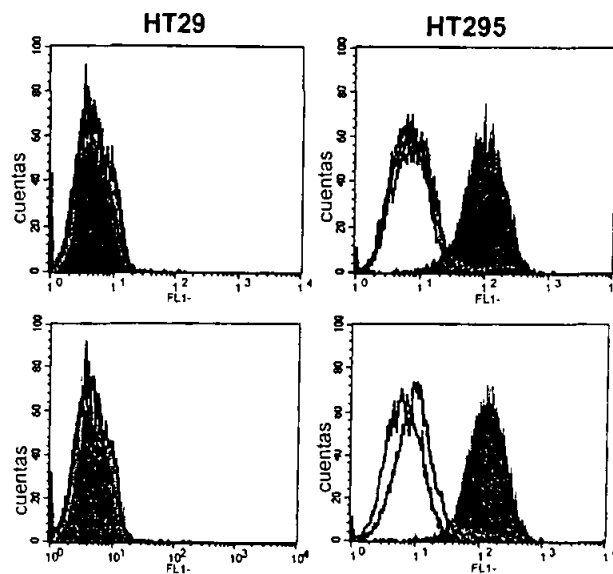


FIGURA 13

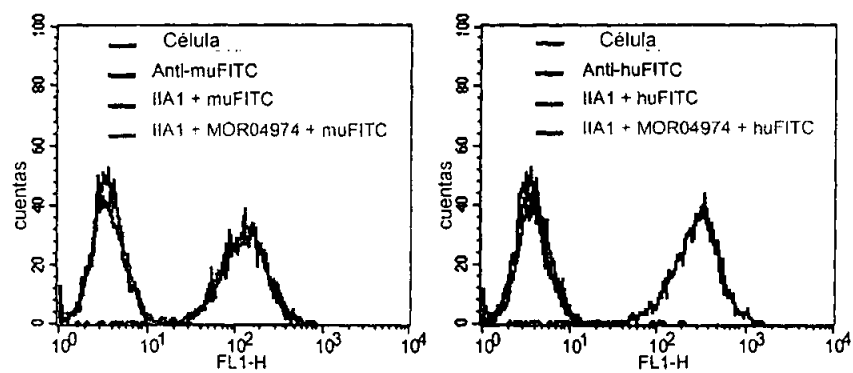


FIGURA 14

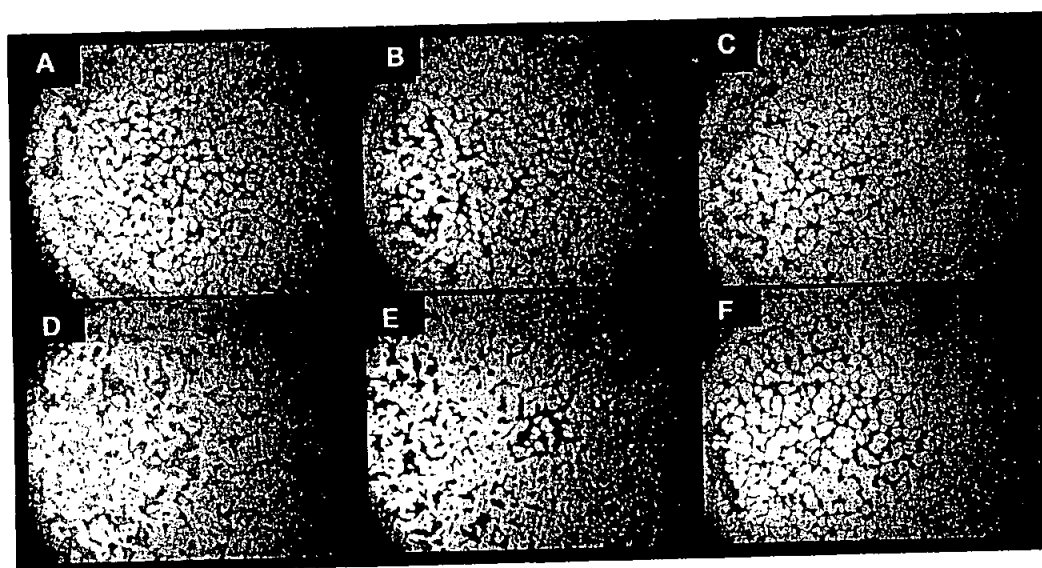


FIGURA 15

A



B

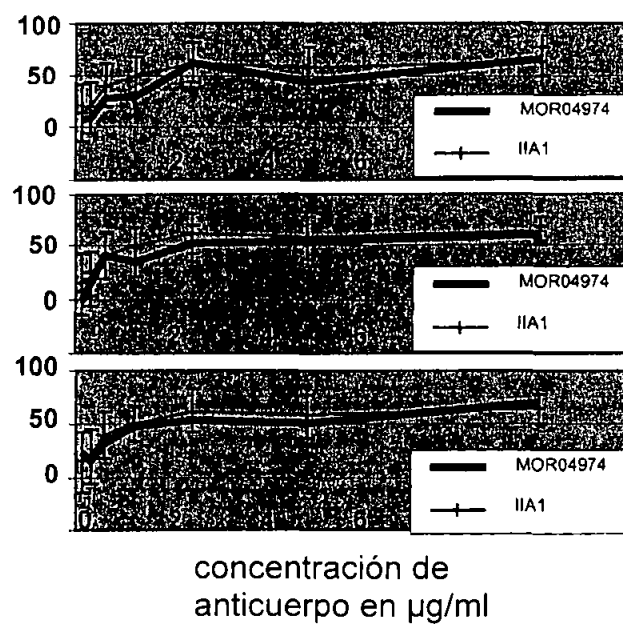


FIGURA 16



FIGURA 17

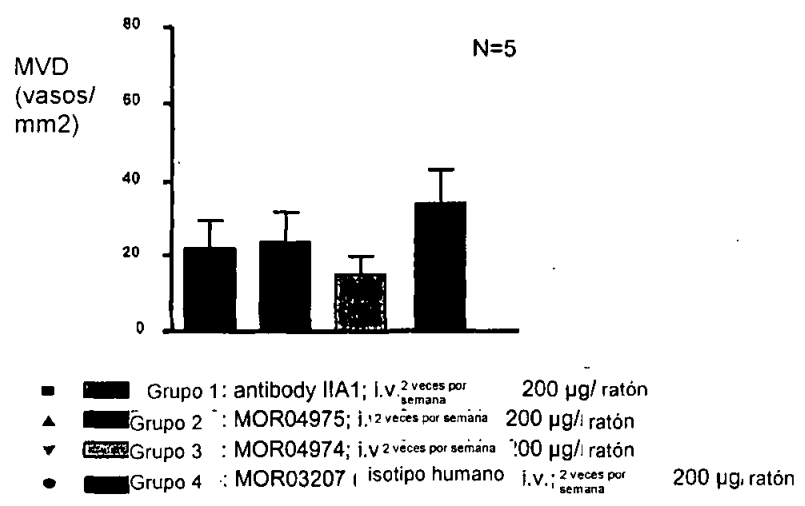
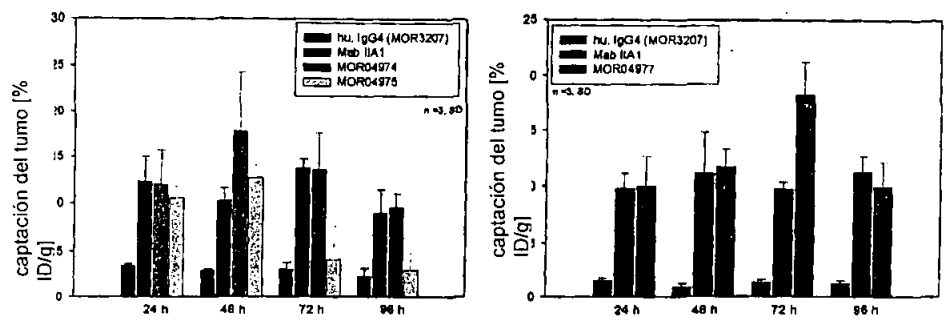


FIGURA 18

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT
Müllerstr. 178
D-13353 Berlin
ALLEMAGNE

Patents & Licensing
28. März 2008
JK/OL

ON-BT
ON

NOTIFICATION OF RECEIPT OF DEMAND BY COMPETENT INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

(PCT Rules 59.3(e) and 61.1(b), first sentence
and Administrative Instructions, Section 601(a))

Date of mailing
(day/month/year) 25-03-2008

Applicant's or agent's file reference
53407AWO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

International filing date (day/month/year)

Priority date (day/month/year)

PCT/EP2007/004648 ✓

21 May 2007 (21-05-2007) ✓

24 May 2006 (24-05-2006)

Applicant

Bayer Schering Pharma AG et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority considers the following date as the date of receipt of the demand for international preliminary examination of the international application:

13 March 2008 (13-03-2008)

2. This date of receipt is:

- ☒ the actual date of receipt of the demand by this Authority (Rule 61.1(b)).
- ☐ the actual date of receipt of the demand on behalf of this Authority (Rule 59.3(e)).
- ☐ the date on which this Authority has, in response to the invitation to correct defects in the demand (Form PCT/IPEA/404), received the required corrections.

3. ☒ **ATTENTION:** That date of receipt is after the expiration of 19 months from the priority date. Consequently, in respect of some Offices, the demand does not have the effect of postponing the entry into the national phase until 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) and the acts for entry into the national phase must therefore be performed within 20 months from the priority date (or later in some Offices). However, in respect of some other Offices, the time limit of 30 months (or later) may nevertheless apply. 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.

- ☐ (If applicable) This notification confirms the information given by telephone, facsimile transmission or in person on:

It has been noted that no reply to the written opinion nor amendments under art.34 PCT have been filed. Your attention is drawn to the fact that as a result the IPRP will merely reflect the contents of the written opinion by ISA.

4. Only where paragraph 3 applies, a copy of this notification has been sent to the International Bureau.

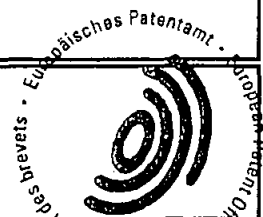
Name and mailing address of the IPEA/



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. (+49-89) 2399-0
Fax: (+49-89) 2399-4465

Authorized officer

de Haas, Bart
Tel: (+31-70)340-4738



PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

BAYER SCHERING PHARMA
AKTIENGESELLSCHAFT
Müllerstraat 178
D-13353 Berlin
ALLEMAGNE

ON 19. Mai 2008

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

15.05.2008

Applicant's or agent's file reference
53407AWO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP2007/004648

International filing date (day/month/year)
21.05.2007

Priority date (day/month/year)
24.05.2006

Applicant
Bayer Schering Pharma AG

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Moreno, Ramon

Tel. +49 89 2399-2658



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 53407AWO	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEA/416	
International application No. PCT/EP2007/004648	International filing date (day/month/year) 21.05.2007	Priority date (day/month/year) 24.05.2006
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C07K16/28		
Applicant Bayer Schering Pharma AG		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in Item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ 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 Article 35(2) 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		
Date of submission of the demand 2008-03-13	Date of completion of this report 15.05.2008	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Ulbrecht, Matthias Telephone No. +49 89 2399-0 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2007/004648

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-38 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-13 as originally filed

Claims, Numbers

1-44 as originally filed

Drawings, Sheets

1/20-20/20 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2007/004648

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>4-15,18-25,39,43,44</u>
	No: Claims	<u>1-3,16,17,26-38,40-42</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-44</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-44</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/004648

Re item V.

1. *Cited documents:*

- D1: WO 2004/056308 A (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; RAMAKRISHNAN VANITHA [US]; POWERS DAVID) 8 July 2004 (2004-07-08)
D2: US-B1-6 852 318 (VARNER JUDITH A [US]) 8 February 2005 (2005-02-08)
D3: WO 2005/092073 A (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; RAMAKRISHNAN VANITHA [US]; BHASKAR VINAY) 6 October 2005 (2005-10-06)
D4: KIM S ET AL: "REGULATION OF ANGIOGENESIS IN VIVO BY LIGATION OF INTEGRIN ALPHA5BETA1 WITH THE CENTRAL CELL-BINDING DOMAIN OF FIBRONECTIN" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 156, no. 4, April 2000 (2000-04), XP000943792 ISSN: 0002-9440 cited in the application

2. *Novelty (Art. 33(2) PCT):*

- 2.1 D1 discloses two humanised anti-human $\alpha 5 \beta 1$ antibodies designated HuM200-G4 and HuM200-g2m3G comprising heavy and light chain amino acid sequences according to SEQ ID Nos. 31 and 32, respectively which are encoded by SEQ ID Nos. 29 and 30 respectively (para. [197], claims 28, 31, 36 and 39). These antibodies have the same affinity as the chimeric antibody M200 shown to have a K_D of 0.367 ± 0.132 nM (Example 7, in particular Fig. 26). As the inhibitory properties referred to in claim 1 appear to be linked to an affinity for $\alpha 5 \beta 1$ integrin ≤ 100 nM and as the antibody M200 is shown to inhibit CNV in vivo which requires said inhibitory property, the said humanised antibodies are considered to fall under the scope of claim 1. These antibodies are used inter alia to treat metastatic malignant neoplasm (para. [147] - [154], claim 46). Also disclosed are nucleic acids encoding said antibodies, vectors comprising said nucleic acids and the production of said antibodies using recombinant expression systems as well as pharmaceutical compositions comprising said antibodies (supra; para. [116] - [121]; claims 23, 27, 32, 34, 40 and 43). Consequently, D1 is prejudicial to the novelty of claims 1, 26, 34, 35, 37, 38, 40 and 41.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/004648

D2 teaches humanised anti- $\alpha 5\beta 1$ antibodies and fragments thereof having specific binding activity for an $\alpha 5\beta 1$ integrin of at least 10^{-7} M^{-1} (c. 10, l. 32-44). These antibodies are used in the treatment of cancer (claims 1 and 7-10). Hence, D2 destroys the novelty of claims 1, 26, 34 and 41.

- 2.2 The only technical feature of composition according to claim 31 is the anti- $\alpha 5\beta 1$ antibody according to any of claims 1-7 or 23-24. Such antibodies, however, are known from D1 and D2 (cf. V.2.1). Hence, said claim lacks novelty over any of D1 and D2 (supra).
- 2.3 The additional features suggested by claims 2, 3, 16, 17, 27-30, 36 and 42 are either explicitly or implicitly disclosed by any of D1 and D2 (supra) and therefore do not establish novelty. The feature proposed by claim 3 appears to be an inherent property of antibodies binding to $\alpha 5\beta 1$ integrin and inhibiting angiogenesis.
- 2.4 The additional features according to claims 32 and 33 are not considered limiting and therefore unsuitable to establish novelty over any of D1 and D2.
- 2.5 The combinations of features suggested by claims 4-15, 18-25, 39, 43 and 44 are not disclosed in the art. These claims are thus novel.
3. *Inventive step (Art. 33(3) PCT):*
 - 3.1 Claims 9-15 propose antibodies limited only by the structural feature of having at least one of the specified CDRs. However, a single CDR does not even confer a specificity. Hence, the proposed antibodies or antibody fragments do not appear to solve a meaningful technical problem, but merely provide an arbitrarily selected antibody obtainable by routine experimentation. These claims do not merit an inventive step.
 - 3.2 Claim 39 refers to a non-human organism obtainable by routine methodology using the nucleic acids or vectors of D1 (supra). No surprising technical effect is associated with said organism which could justify an inventive step.

- 3.3 Claims 43 and 44 refer to an application of the antibody of D1 or D2 immediately derivable from its specificity which does not establish an inventive step as it does not produce any unforeseeable technical effect.
- 3.4 Claims 4-8 suggest an antibody characterised by at least one CDR. A single CDR does not confer any specific property to the antibody. Hence, said CDRs are considered an arbitrarily selected alternatives to one of the CDRs present for instance in the HuM200 of D1. Consequently, an inventive step has to be denied.
- 3.5 Claims 18-25 relate to routine modifications or variants of the antibody disclosed by D1 or D2 which do not produce any surprising technical effect. These variants or modifications are arbitrarily selected and do not establish an inventive step.
- 3.6 Also D3 and D4 appear to be relevant for the assessment of the inventiveness of the subject-matter of claims 1-44.

4. *Industrial applicability (Art. 33(4) PCT):*

Industrial applicability of the subject-matter of claims 1-44 is acknowledged.

5. *Clarity (Art. 6 PCT).*

- 5.1 Claims 1-3 attempt to define their subject-matter in terms of a result to be achieved which in the present case only amounts to a definition by the underlying problem without defining the necessary structural features. Consequently, the scope of said claims is not determinable without undue burden.
- 5.2 Claims 9-17 relate to an antibody fragment without providing a functional limitation therefore. Hence, any peptide fragment of the antibodies referred to in said claims are covered e.g. even those not having any antigen binding activity, thereby obscuring the scope of said claims

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BAYER SCHERING PHARMA
AKTIENGESELLSCHAFT
Müllerstrasse 178
13353 Berlin
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 04 January 2008 (04.01.2008)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 53407AWO	
International application No. PCT/EP2007/004648	
	International filing date (day/month/year) 21 May 2007 (21.05.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☒ the person	☐ the name	☐ the address
☐ the nationality	☐ the residence	
Name and Address STEIDL, Stefan Planegger Str. 37 81241 München Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: Additional inventor for all designated States and applicant for US only.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☒ the designated Offices concerned	
☒ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned	
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Wimmer Peter
Facsimile No. +41 22 338 89 70	e-mail pt06.pct@wipo.int
Form PCT/IB/306 (October 2005)	Telephone No. +41 22 338 74 06

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BAYER SCHERING PHARMA
AKTIENGESELLSCHAFT
Müllerstrasse 178
13353 Berlin
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 04 January 2008 (04.01.2008)	
Applicant's or agent's file reference 53407AWO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2007/004648	International filing date (day/month/year) 21 May 2007 (21.05.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☒ the person	☐ the name	☐ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address PRASSLER, Josef Kriegerstrasse 8a 82110 Germering Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: Additional inventor for all designated States and applicant for US only.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☒ the designated Offices concerned	
☒ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned	
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Wimmer Peter
Facsimile No. +41 22 338 89 70	e-mail pt06.pct@wipo.int
Form PCT/IB/306 (October 2005)	Telephone No. +41 22 338 74 06

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BAYER SCHERING PHARMA
AKTIENGESELLSCHAFT
Müllerstrasse 178
13353 Berlin
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 04 January 2008 (04.01.2008)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 53407AWO	
International application No. PCT/EP2007/004648	International filing date (day/month/year) 21 May 2007 (21.05.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address PETIT-FRÈRE, Corinne Freibadstr. 20a 81543 München Germany	State of Nationality FR	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:
Additional inventor for all designated States and applicant for US only.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Wimmer Peter e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
---	--

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 November 2007 (29.11.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/134876 A3

(51) International Patent Classification:

C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

PETIT-FRÈRE, Corinne [FR/DE]; Freibadstr. 20a,
81543 München (DE).

(21) International Application Number:

PCT/EP2007/004648

(22) International Filing Date: 21 May 2007 (21.05.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

06010779.4 24 May 2006 (24.05.2006) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **BAYER
SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT**
[DE/DE]; Müllerstrasse 178, 13353 Berlin (DE).

(71) Applicant: **MORPHOSYS AG** [DE/DE]; Lena-Christ-
Str. 48, 82152 Martinsried/Planegg (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **MENRAD, An-
dreas** [DE/GB]; 141 Mainstreet Witchford, Ely Cambs,
Cambridgeshire CB6 2HP (GB). **WILLUDA, Jörg**
[DE/DE]; Platanenstr. 3, 13156 Berlin (DE). **BOSSLET,
Klaus** [DE/DE]; Im Anseltal 57, 13465 Berlin (DE).
ZOPF, Dieter [DE/DE]; Neuwerker Weg 15a, 14167
Berlin (DE). **PETRUL, Heike** [DE/DE]; Richard-Sorge
Strasse 72, 10249 Berlin (DE). **STEIDL, Stefan** [DE/DE];
Planegger Str. 37, 81241 München (DE). **PRASSLER,
Josef** [DE/DE]; Kriegerstrasse 8a, 82110 Germering (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, 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
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the international search report:
27 March 2008

(15) Information about Correction:

Previous Correction:
see Notice of 14 February 2008

(54) Title: HIGH AFFINITY HUMAN AND HUMANIZED ANTI- $\alpha 5\beta 1$ INTEGRIN FUNCTION BLOCKING ANTIBODIES
WITH REDUCED IMMUNOGENICITY

(57) Abstract: The present invention relates to recombinant human or humanized polypeptides which bind to $\alpha 5\beta 1$ integrin with
high affinity and blocking function. Further, diagnostic and pharmaceutic applications of the polypeptides are disclosed.

WO 2007/134876 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/004648

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 C12N15/63 A01K67/027		
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) C07K 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/056308 A (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; RAMAKRISHNAN VANITHA [US]; POWERS DAVID) 8 July 2004 (2004-07-08) paragraph [0009] - paragraph [0021] paragraph [0116] - paragraph [0121] paragraphs [0147] - [0154] example 7 figure 26 sequences 29-32 claims 23,27,28,31,32,34,36,39,40,43,46 -----	1-44
X	US 6 852 318 B1 (VARNER JUDITH A [US]) 8 February 2005 (2005-02-08) column 10, line 32 - line 44 example 4 claims 1,7-10 ----- -/--	1-44
☒ 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 *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *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 *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 *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 *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. *A* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 November 2007		Date of mailing of the international search report 15/01/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ulbrecht, Matthias

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/004648

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/092073 A (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; RAMAKRISHNAN VANITHA [US]; BHASKAR VINAY) 6 October 2005 (2005-10-06) page 11, line 10 - page 12, line 32 page 15, line 28 - page 23, line 26 claims 1,5 -----	1-44
X	KIM S ET AL: "REGULATION OF ANGIOGENESIS IN VIVO BY LIGATION OF INTEGRIN ALPHA5BETA1 WITH THE CENTRAL CELL-BINDING DOMAIN OF FIBRONECTIN" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 156, no. 4, April 2000 (2000-04), XP000943792 ISSN: 0002-9440 cited in the application abstract page 1346, right-hand column, paragraph 1 - page 1347, left-hand column, last paragraph page 1360, right-hand column, paragraph 2 -----	1-44
A	KREBS B ET AL: "High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 254, no. 1-2, 1 August 2001 (2001-08-01), pages 67-84, XP004245443 ISSN: 0022-1759 cited in the application the whole document -----	1-44
A	COMINETTI M R ET AL: "BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the Bothrops alternatus snake venom that interacts with alpha5beta1 integrin" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, NEW YORK, US, US, vol. 416, no. 2, 15 August 2003 (2003-08-15), pages 171-179, XP004441377 ISSN: 0003-9861 abstract page 172, right-hand column, paragraph 2 figure 6 -----	1-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/004648

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004056308	A	08-07-2004	AU 2003298783 A1	14-07-2004
			BR 0316670 A	11-10-2005
			CA 2507099 A1	08-07-2004
			CN 1753911 A	29-03-2006
			EP 1575516 A2	21-09-2005
			JP 2006516098 T	22-06-2006
			KR 20050089151 A	07-09-2005
			MX PA05005558 A	26-07-2005
US 6852318	B1	08-02-2005	US 2002172675 A1	21-11-2002
			US 2004077544 A1	22-04-2004
WO 2005092073	A	06-10-2005	AU 2005226736 A1	06-10-2005
			BR PI0509177 A	18-09-2007
			CA 2560508 A1	06-10-2005
			EP 1755659 A2	28-02-2007
			KR 20070009637 A	18-01-2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-124719-00000-0000
Fecha 2008-11-24 15:53:48 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE (YII) Eve. 379 FASE NACIONAL II
Act. 411 PRESENTACION Folios. 186



REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PCT

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

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

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 20/06/2008

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

188

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RAISBECK J. IAN
Apoderado(a) y/o Representante de
BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT
MORPHOSYS AG

REFERENCIA	Radicación No.	8 124719
	Solicitud internacional	PCT/EP2007/004648
	Fecha inicio fase nacional	24/12/2008
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	0578

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

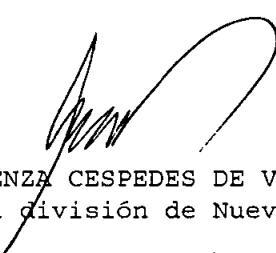
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

789

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 8 124719



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 23 ENE. 2009
jfernand