



**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA



Delegatura de propiedad Industrial  
División de Nuevas Creaciones

Organización y  
CSA Ltda

PCT

SOLICITUD  
**PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No.

08-115094

54. TÍTULO

ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANIZADOS PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO  
DEL HEPATOCITO.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

CLID 3/00

71. SOLICITANTE

GALAXI BIOTECH, LLC.

DOMICILIO

CUPERTINO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D. C.,



No. 08-115094- -00000-0000

Fecha: 2008-10-28 15:21:37 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eje. 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE  
PCT**

**ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1 Nov. 2008

**SOLICITUD DE:**

1



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

2

**SOLICITANTE  
(71)**

**Nombre:** GALAXY BIOTECH, LLC.

**Dirección:** 22830 San Juan Road, Cupertino,  
California 95014, Estados Unidos de América.

**Nacionalidad o domicilio:** Cupertino,  
California, Estados Unidos de América.

**Lugar de Constitución:** California, Estados  
Unidos de América.

**Teléfono:**

**Fax:**

**E-mail**

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

**Número**

3

**REPRESENTANTE  
O APODERADO  
(74)**

**Nombre:** DILIA MARÍA RODRÍGUEZ  
D'ALEMAN

**Dirección:** Carrera 11 No. 86-53, piso 6

**Teléfono:** 6 181088 **Fax:** 6350824

**E-mail:** clarkemodet@clarkemodet.com.co

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

**Número** 41.654.882  
TP 20824 CSJ

4

**INVENTOR (ES)  
(72)**

**Nombre:** VER ANEXOS

**Dirección:**

**Nacionalidad o domicilio:**

5

**PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/065385 Fecha 28 de marzo de de 2007

Publicación Internacional No. WO 2007/115049 A2 Fecha 11 de octubre de 2007

6 **TÍTULO (54)** ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANIZADOS PARA EL FACTOR DE  
CRECIMIENTO DEL HEPATOCITO.

7 **Clasificación Internacional (51)** C11D 3/00

8 **Prioridad**

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

(32) Fecha

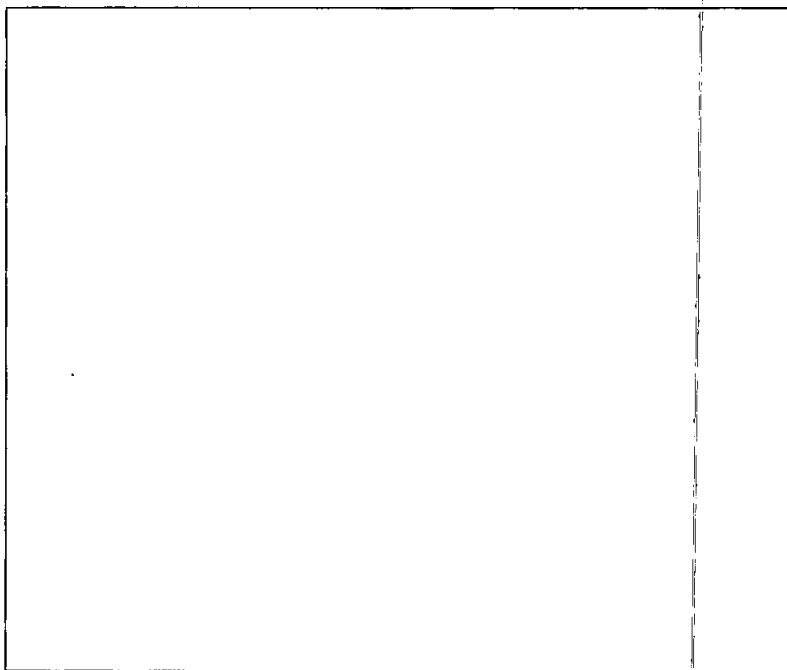
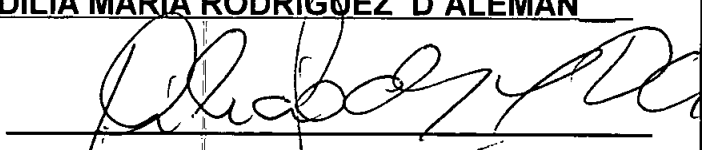
1 de abril de 2006

(31) Número de Solicitud

60/788,243

9 **Comprobant de pago No.** 08 - 83.375 **F cha** 22 de octubre de 2008

- ☐ 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
- ☐ 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 de 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 Opinión escrita.

**11 FIGURA CARACTERÍSTICA****12 Solicito la concesión de la patente**NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMANFIRMA: 

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-115094- -00000-0000

Fecha: 2008-10-28 15:21:37 Dep. 2020 NUECREACION  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI  
Act 411 PRESENTACION Folios: 73

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 83,375  
FECHA : OCTUBRE 22 DE 2008

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE                 | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|-----------------------------|--------------|-----------------|-----------|----------|------------|---------------|
| CLARKE MODET Y CO. COLOMBIA | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 94343303 | 21/10/2008 | 49,440,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| 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 : \_\_\_\_\_

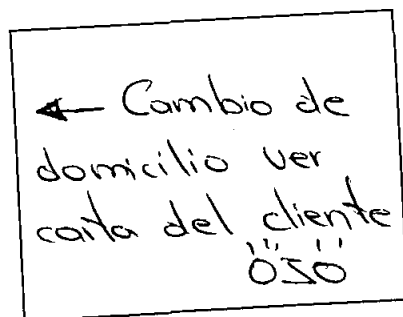
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

P-1509

## ANEXOS

### INVENTORES

- 1.) **KIM, Kyung, Jin**  
( 22830 San Juan Road, Cupertino, California 95014, Estados Unidos de América );
- 2.) **WANG, Lihong**  
( 275 Ventura Ave #24, Palo Alto, California 94306, Estados Unidos de América );
- 3.) **PARK, Hangil**  
( 1325 Indiana St., #102, San Francisco, California 94107, Estados Unidos de América );
- 4.) **VASQUEZ, Maximiliano**  
( 2813 Louis Road, Palo Alto, California 94303, Estados Unidos de América ).



7.848

TRADUCCION OFICIAL NO. 1086/2006.-

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES; LLEVA SELLO Y FIRMA DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL, SEGÚN RESOLUCION No. 3618 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA EL 6 DE SEPT. DE 1972.

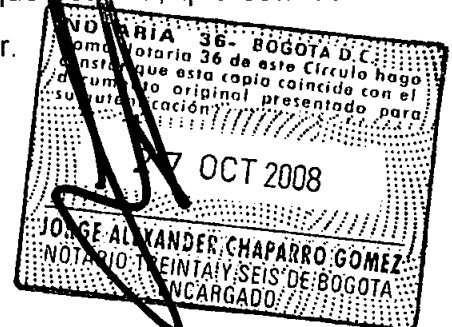
TRADUCCION DE LOS SELLOS QUE SE ENCUENTRAN EN EL PODER OTORGADO POR **CARY QUEEN** REPRESENTATNE LEGAL DE **GALAXY BIOTECH, LLC.**, UNA SOCIEDAD ORGANIZADA Y EN EXISTENCIA DE ACUERDO CON LAS LEYES DE DELAWARE, Y EN ACTUAL CUMPLIMIENTO DE SU OBJETO SOCIAL, CON DOMICILIO EN 22830 SAN JUAN ROAD, CUPERTINO, CALIFORNIA, 95014, A LAS DOCTORAS DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN Y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ.

ORTORGADO Y FIRMADO EN PALO ALTO, CALIFORNIA, EL 15 DE NOVIEMBRE DE 2006. FIRMADO: CARY QUEEN.

**CERTIFICACION NOTARIAL**  
**(CUANDO EL SOLICITANTE ES UNA SOCIEDAD)**

A los 15 días del mes de Noviembre de 2006 el Notario que suscribe DA FE que:

1. **DR. CARY QUEEN**, mayor de edad y domiciliado en 390 Lyfton Ave Palo Alto, California, firmó de su puño y letra el documento que antecede.
2. Conoce al otorgante y que este está legalmente capacitado para el otorgamiento.
3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de **PRESIDENTE** como Administrador Delegado para Asuntos Administrativos de la persona jurídica **CLAXY BIOTECH LLC.**
4. La citada persona jurídica, con sede en 22830 San Juan Rd. Cupertino, California, está legalmente constituida, que tiene actualmente existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.
5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.



TRADUCCION OFICIAL NO. 1086/2006.-

6. Las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque he tenido a la vista los documentos auténticos que me fueron presentados para tal fin.

FIRMADO: CLAUDIA B. ALEXANDER, NOTARIO PUBLICO, CALIFORNIA  
CONDADO DE SANTA CLARA. HAY SELLO DEL NOTARIO.

**AUTENTICACIÓN GENERAL DE CALIFORNIA**  
**ESTADO DE CALIFORNIA – CONDADO DE ALAMEDA**

El día 15 de Noviembre de 2006 ante mí, **CLAUDIA B. ALEXANDER**, Notario Público, compareció **DR CARY QUEEN**, quien presentó como identificación su Licencia de Conducción de California, y es la persona cuyo nombre suscribe el presente documento y reconoció ante mí que suscribió el mismo en su condición autorizada y que mediante su firma en el instrumento la persona o entidad a nombre de la cual actuó, suscribió el instrumento.

EN EVIDENCIA FIRMO Y PONGO EL SELLO OFICIAL.

FIRMADO POR: CLAUDIA B. ALEXANDER, NOTARIO PUBLICO, CON COMISIÓN  
HASTA EL 21 DE ENERO DE 2010. HAY SELLO DEL NOTARIO.

**OPCIONAL**

Aunque los datos siguientes no son requeridos por la ley, pueden ser útiles para las personas que se basan en el documento adjunto y pueden impedir la utilización fraudulenta de esta certificación.

**DESCRIPCIÓN DEL DOCUMENTO ADJUNTO:**

TITULO O TIPO DE DOCUMENTO: PODER PARA COLOMBIA Y CERTIFICADO  
NOTARIAL

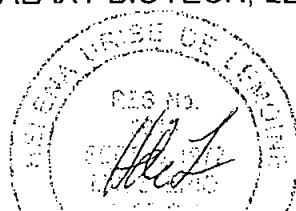
NUMERO DE PAGINAS: 2;

FECHA: 15 DE NOVIEMBRE DE 2006

CARGO DE LA PERSONA QUE FIRMA: PRESIDENTE

NOMBRE DEL FIRMANTE: DR. CARY QUEEN

EL FIRMANTE REPRESENTA A: GALAXY BIOTECH, LLC.



**ESTADO DE CALIFORNIA  
SECRETARIO DE ESTADO  
APOSTILLA**

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

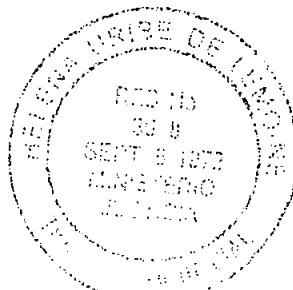
1. País: Estados Unidos de América  
El presente documento público
2. Ha sido firmado por: CLAUDIA B. ALEXANDER
3. Actuando en su calidad de: Notario Público, Estado de California
4. Lleva el sello de: CLAUDIA B. ALEXANDER, Notario Público, Estado de California

**Certificado**

5. En Sacramento, California
6. El día 27 de Noviembre de 2006
7. Por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
8. No. **328111**
9. Sello: Hay Sello del Secretario de Estado del Estado de California
10. POR ILEGIBLE., SECRETARIO DE ESTADO,  
FIRMADO: ILEGIBLE.

-----  
LA TRADUCTORA OFICIAL

*Helena Dubé de Lencina*



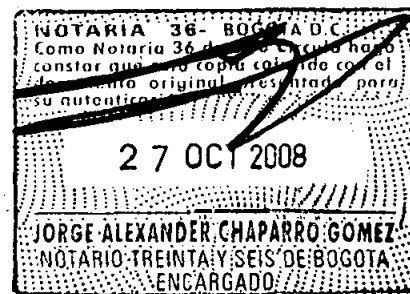
NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2007 OCT 27 P 2:16

*Wm*  
JEFE DE LEVANTACIONES  
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE  
RELACIONES EXTERIORES

549440  
*Helena*  
COTIA FIRMA AFILIADA EN EL  
DOCUMENTO DESIEMPRE  
LAS FUNCIONES INDICADAS



# State of California

## SECRETARY OF STATE

### APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America  
This public document
2. has been signed by CLAUDIA B. ALEXANDER
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of CLAUDIA B. ALEXANDER, Notary Public,  
State of California

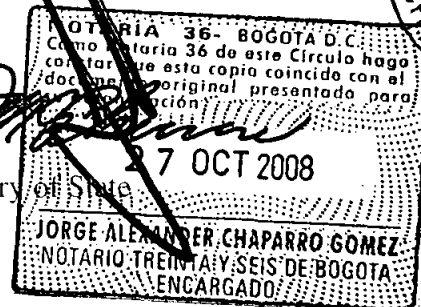
### CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 27th day of November 2006
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 328111
9. Seal/Stamp:

10. Signature



*[Signature]*  
Secretary of State



State of California

County of Santa Clara } ss.

## CALIFORNIA ALL-PURPOSE CERTIFICATE OF ACKNOWLEDGMENT

On Nov. 15, 2006, before me, Claudia B. Alexander,  
Date Printed Name of Notary Public

personally appeared Dr. Cary Queen

Printed Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me - or -

☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence:

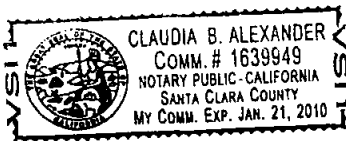
☒ form(s) of identification

California Drivers License

☐ credible witness(es)

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.



(Seal)

Claudia B. Alexander

Signature of Notary Public

### OPTIONAL INFORMATION

Although the information in this section is not required by law, it could prevent fraudulent removal and reattachment of this acknowledgment to an unauthorized document and may prove useful to persons relying on the attached document.

#### Description of Attached Document

The preceding Certificate of Acknowledgment is attached to a document

titled/for the purpose of Columbian Power of Attorney & Notarial Certificate

containing 2 pages, and dated Nov. 15, 2006

The signer(s) capacity or authority is/are as:

☐ Individual(s)

☐ Attorney-in-Fact

☒ Corporate Officer(s)

President

Title(s)

Dr. Cary Queen

☐ Guardian/Conservator

☐ Partner - Limited/General

☐ Trustee(s)

☐ Other:

representing: Galaxy Biotech LLC

Name(s) of Person(s) or Entity(ies) Signer is Representing

#### Additional Information

☐ Additional Signer(s)

☐ Signer(s) Thumbprint(s)

☐ Other



P. 848

# COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkemodet.com.co

## PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

**Cary Queen**

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

**Galaxy Biotech, LLC**

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

**Delaware**

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

**22830 San Juan Road  
Cupertino, California 95014**

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñanzas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

**Cary Queen**  
Firma / signature

## POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

**Cary Queen**

legal representative(s) of

**GALAXY BIOTECH, LLC**

an organization existing under the laws of

**Delaware**

and in present execution of its business activity, domiciled at

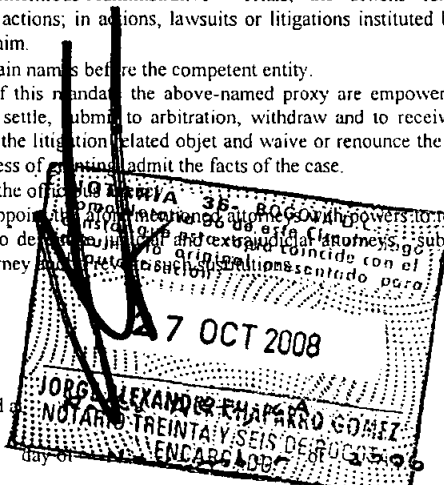
**22830 San Juan Road  
Cupertino, California 95014**

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models, Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related objet and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the official agency.
- 8) I (we) hereby appoint (appoint) the above-named proxy to receive notifications and to defend (defend) the interests of the grantor, to substitute this Power of Attorney and to perform all the acts and legal proceedings that may be necessary in connection with the above.

Granted and signed

on this 15



022382-000120CO

9

## CERTIFICADO NOTARIAL

(Cuando el solicitante es SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, México y Venezuela)

A los 15 días del mes de Noviembre de 2006, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. Dr. Cary Queen  
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en 390 Lytton ave  
Palo Alto, CA firmó de su puño  
y leña el documento que antecede.

2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está legalmente capacitado para el otorgamiento.

3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de Presidente  
de la persona jurídica Galaxy Biotech, LLC

4. La citada persona jurídica con sede en 22830 San Juan  
Rd. Cupertino, CA está legalmente

constituida, que tiene actualmente  
existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este  
poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que  
esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.

6. Las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque  
he tenido a la vista los documentos auténticos.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Consúl de Colombia debe  
autenticar la firma del Notario Público.

## CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es INDIVIDUO)

A los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_  
, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. \_\_\_\_\_  
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en \_\_\_\_\_  
firmó en su presencia  
el documento que antecede, conoce al otorgante y que este está  
legalmente capacitado para el otorgamiento.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Consúl de Colombia debe  
autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Consúl de Colombia o ante  
quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia  
1) de la existencia legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce actual-  
mente su objeto social, y 3) de que la persona o personas que otorgan  
el poder están facultadas para hacerlo, dejando  
constancia así mismo de que tuvo a la vista las pruebas que acrediten  
tales circunstancias.

LEGALIZACIÓN POR EL CONSUL DE COLOMBIA  
O POR APOSTILLA

## NOTARIAL CERTIFICATE

(When the applicant is a CORPORATION)

(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A. and Venezuela)

This 15 day of November, 2006  
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. Dr. Cary Queen  
(name of the person who signs the power of attorney)

of 390 Lytton ave legal age and domiciled  
in Palo Alto, CA set his hand on  
the foregoing document.

2. The grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to  
execute the document.

3. The grantor has executed the foregoing document in his capacity  
of President  
of the juridical person Galaxy BioTech, LLC

4. The mentioned juridical person with place of business  
in 22830 San Juan Rd. Cupertino, CA  
is duly organized, has actual legal existence and that the purposes for which  
the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. The grantor has in fact the referred quality and that his/her  
representation is legal and that he/she is empowered to grant this power  
of attorney.

6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on the authentic documents  
which for such purpose were exhibited to me.

Claudia B. Alexander  
Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must  
Public.

## NOTARIAL CERTIFICATE (When the applicant is an INDIVIDUALS)

On this \_\_\_\_\_ day of \_\_\_\_\_  
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. \_\_\_\_\_  
(name of the person who signs the Power of Attorney)

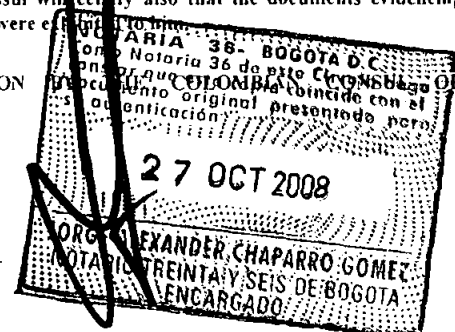
of legal age and domiciled at \_\_\_\_\_  
signed in his presence the foregoing  
document, the grantor is to him personally known and that he/she has legal  
capacity to execute the document.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary  
Public.

For all other countries the Colombian Consul or before who it is granted  
must issue a certification stating 1) the legal existence of the corporation,  
2) that the corporate purposes are actually being accomplished, 3) that  
the person or persons who grant this Power of Attorney are empowered to  
do it. The Consul will certify also that the documents evidencing those  
circumstances were exhibited to him.

LEGALIZATION BY \_\_\_\_\_  
APOSTILLE.



### Resumen de la Invención

La presente invención se dirige hacia un anticuerpo monoclonal humanizado neutralizador del factor de crecimiento del hepatocito, una composición farmacéutica que lo incluye, 5 y los métodos de tratamiento que incluyen la administración de tal composición farmacéutica a un paciente.

**ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANIZADOS PARA EL FACTOR DE  
CRECIMIENTO DEL HEPATOCITO**

**Referencia Cruzada a las Solicitudes Relacionadas**

5        La presente solicitud es no-provisional de la solicitud  
USSN 60/788,243 presentada el 1ro de Abril del 2006, la cual  
se incorpora aquí a manera de referencia en su totalidad para  
todos los propósitos.

10        **Estado del Interés del Gobierno**

El trabajo descrito en esta solicitud fue constituido  
en parte por Grant 2R44CA101283-02 de los Institutos  
Nacionales de Salud. El gobierno de los E.U. puede tener  
ciertos derechos en esta invención.

15

**Campo de la Invención**

La presente invención se refiere de manera general a la  
combinación del anticuerpo monoclonal (mAb, por sus siglas en  
inglés) y las tecnologías de recombinación de ADN para  
20 desarrollar agentes biológicos, y de manera más particular,  
por ejemplo, para producir anticuerpos monoclonales  
humanizados que se enlazan y neutralizan al Factor de  
Crecimiento del Hepatocito.

25

**Antecedentes de la Invención**

El Factor de Crecimiento del Hepatocito Humano (HGF,  
por sus siglas en inglés) es un polipéptido heterodimérico  
multifuncional producido por las células mesenquimales. El  
30 HGF ha mostrado que estimula la angiogénesis, morfogénesis y  
motogénesis, así como también el crecimiento y dispersión de

varios tipos de células (Bussolino et al., J. Cell. Biol. 119: 629, 1992; Zarnegar y Michalopoulos, J. Cell. Biol. 129:1177, 1995; Matsumoto et al., Ciba. Found. Symp. 212:198, 1997; Birchmeier y Gherardi, Trends Cell. Biol. 8:404, 1998; Xin et al. Am. J. Pathol. 158:1111, 2001). Las actividades pleiotrópicas del HGF son mediadas a través de su receptor, una tirosina cinasa de transmembrana codificada por medio del c-Met proto-oncógeno. Además de regular una variedad de funciones celulares normales, el HGF y su receptor c-Met han

10 mostrado que se encuentran implicados en la iniciación, invasión y metástasis de los tumores (Jeffers et al., J. Mol. Med. 74:505, 1996; Comoglio y Trusolino, J. Clin. Invest. 109:857, 2002). Los HGF/c-Met son co-expresados, a menudo sobre-expresados, en varios tumores humanos sólidos

15 incluyendo los tumores derivados del pulmón, colon, recto, estómago, riñón, ovarios, piel, varios mielomas y tejido tiroidal (Prat et al., Int. J. Cancer 49:323, 1991; Chan et al., Oncogene 2:593, 1988; Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993; Derksen et al., Blood 99:1405,

20 2002). El HGF actúa como un factor de crecimiento autocrino (Rong et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4731, 1994; Koochekpour et al., Cancer Res. 57:5391, 1997) y paracrino (Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993) y regulador anti-apoptótico (Gao et al., J. Biol. Chem.

25 276:47257, 2001) para estos tumores.

El HGF es una proteína de 102 kDa con secuencia y estructura similares a la plasminogena y otras enzimas de la coagulación sanguínea (Nakamura et al., Nature 342:440, 1989; Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993).

30 El HGF humano es sintetizado como un precursor 728 de aminoácido (preproHGF, por sus siglas en inglés), que

experimenta una segmentación intracelular hacia una forma de cadena única inactiva (proHGF, por sus siglas en inglés) (Nakamura et al., Nature 342:440, 1989; Rosen et al., J. Cell. Biol. 127:1783, 1994). En la secreción extracelular, la proHGF es segmentada para producir la molécula heterodimérica unida a un disulfuro, activa biológicamente, compuesta de una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$  (Nakamura et al., Nature 342:440, 1989; Naldini et al., EMBO J. 11:4825, 1992). La subunidad  $\alpha$  contiene 440 residuos (69 kDa con glicosilación), que consisten en el dominio N-terminal horquilla y cuatro dominios kringle. La subunidad  $\beta$  contiene 234 residuos (34 kDa) y tiene un dominio tipo proteasa de serina, que carece de actividad proteolítica. El HGF tiene dos sitios específicos de enlace celular únicos: un sitio de alta afinidad de enlace ( $K_d = 2 \times 10^{-10}$  M) para el receptor del c-Met y un sitio de baja afinidad de enlace ( $K_d = 10^{-9}$  M) para los proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPG, por sus siglas en inglés), que se encuentran presentes en la superficie de la célula y la matriz extracelular (Naldini et al., Oncogene 6:501, 1991; Bardelli et al., J. Biotechnol. 37:109, 1994; Sakata et al., J. Biol. Chem., 272:9457, 1997).

El receptor c-Met es un miembro de la familia de receptores de las proteína tirosina-cinasa de clase IV. El gen c-Met de longitud completa fue clonado e identificado como el proto-oncógeno c-Met (Cooper et al., Nature 311:29, 1984; Park et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6379, 1987). La NK2 (una proteína que abarca la terminal N y los dos primeros dominios kringle de la subunidad  $\alpha$ ) es suficiente para enlazar el c-Met con la activación de la caída de señalización para la motilidad, sin embargo, la longitud total de la proteína se requiere para la respuesta

mitogenética (Weidner et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:229, 1993). El HSPG enlaza al HGF al interactuar con la terminal N del HGF.

El HGF/c-Met ha sido reportado juega un papel importante en varios aspectos del desarrollo del cáncer como la iniciación del tumor, la invasión, la metástasis, la regulación de la apoptosis y la angiogénesis. Varias propuestas diferentes han sido investigadas para obtener una molécula antagonista efectiva: proteínas de HGF truncadas como la NK1 (dominio de terminal N más dominio kringle 1; Lokker et al., J. Biol. Chem. 268:17145, 1993), NK2 (dominio de terminal N más dominios kringle 1 y 2; Chan et al., Science 254:1382, 1991) y NK4 (dominio de terminal N más cuatro dominios kringle; Kuba et al., Cancer Res. 60:6737, 2000), mAbs anti-c-Met (Dodge, Master's Thesis, San Francisco State University, 1998) y mAbs anti-HGF (Cao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:7443, 2001, que se incorpora aquí a manera de referencia).

NK1 y NK2 pueden competir de manera efectiva con el enlace del HGF con su receptor, pero ha sido reportado que tiene actividades antagonistas parciales *in vitro* (Cioce et al., J. Biol. Chem. 271:12110, 1996; Schwall et al., J. Cell Biol. 133:709, 1996), en lugar de solamente actividades antagonistas exclusivas. De manera más reciente, Kuba et al., Cancer Res. 60:6737, 2000, reportó que la NK4 podría inhibir parcialmente el crecimiento primario y la metástasis del tumor murino de pulmón LLC en un modelo de ratón desnudo por medio de la infusión continua de NK4. Sin embargo, el hecho de que la NK4 tenía que ser administrada de manera continua para obtener una inhibición parcial del crecimiento de tumores primarios indica un periodo de vida potencialmente

corto de la molécula de la NK4 y/o la carencia de potencia.

Cao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:7443, 2001, reportó que la administración de un coctel de tres mAbs anti-HGF, que se seleccionaron en base a su habilidad de inhibir la actividad de dispersión del HGF *in vitro*, fue capaz de inhibir el crecimiento de tumores humanos en el modelo del xenoinjerto de ratón desnudo. Ellos postularon que se requirieron tres mAbs que reconocieron tres sitios diferentes de enlace en el HGF para inhibir las bioactividades del HGF *in vivo*: dos mAbs inhibieron el enlace del HGF con el c-Met y un mAb inhibió el enlace del HGF con la heparina.

Recientemente, han sido reportados los mAbs humanos que se enlazan individualmente y neutralizan el HGF desarrollado usando tecnología de ratón transgénico (Burgess et al., WO 2005/017107A2 y Burgess et Al., Cancer Res 66:1721, 2006, cada uno de los cuales se incorpora aquí a manera de referencia para todos los propósitos). Sin embargo, de estos por lo menos el mAb 2.12.1, que aparentemente fue el más potente en los modelos de xenoinjerto del tumor, no inhibió la angiogénesis. Un mAb L2G7 de ratón ha sido desarrollado, el cual neutraliza todas las actividades biológicas probadas del HGF incluyendo la angiogénesis (Solicitud de Patente USSN 10/917,915, presentada el 13 de Agosto del 2004, y Kim et al., Clin Cancer Res 12:1292, 2006, cada una de las cuales se incorpora aquí a manera de referencia para todos los propósitos).

De este modo, existe la necesidad de un anticuerpo monoclonal humanizado que bloquee la actividad biológica del HGF *in vitro* e *in vivo*. La presente invención cubre esta y otras necesidades.

### Breve Descripción de la Invención

En una modalidad, la invención proporciona un mAb humanizado neutralizador del Factor de Crecimiento del Hepatocito (HGF, por sus siglas en inglés) humano. El mAb  
5 inhibe por lo menos una, y preferentemente varias o todas, las actividades biológicas del HGF incluyendo el enlace con su receptor c-Met, la inducción de la dispersión de las células tales como las células Madin-Darby de riñón canino, la inducción de la proliferación de las células epiteliales  
10 de pulmón de visón Mv 1 Lu y/o los hepatocitos y/o las HUVEC, y la estimulación de la angiogénesis. Un mAb anti-HGF humanizado preferido inhibe, de manera más preferible inhibe completamente, el crecimiento de un xenoinjerto de tumor humano en un ratón. En una modalidad preferida, el mAb  
15 humanizado es un mAb L2G7 humanizado. En una modalidad especialmente preferida, las regiones variables de cadena pesada y ligera del mAb tienen las secuencias mostradas en las líneas etiquetadas como HuL2G7 en la Figura 2A y la Figura 2B, respectivamente, o las secuencias que son por lo  
20 menos 90% o más idénticas a ellas. En otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado (mAb) que enlaza y neutraliza al Factor de Crecimiento del Hepatocito (HGF, por sus siglas en inglés) humano, incluyendo el anticuerpo humanizado las cadenas pesada y ligera  
25 humanizadas. La cadena pesada humanizada incluye CDRs del L2G7 y un marco abierto de lectura de la región variable de la cadena pesada humana provista de modo que por lo menos una posición del marco abierto de lectura de la región de la cadena pesada humana, seleccionada del grupo que consiste de  
30 H29, H30, H48, H66, H67, H71, H94, es ocupada por el aminoácido que ocupa la posición correspondiente en la cadena

pesada del L2G7. La cadena ligera humanizada incluye CDRs del L2G7 y un marco abierto de lectura de la región variable de la cadena ligera humana provista de modo que por lo menos una posición seleccionada del grupo que consiste de L3 y L60, es  
 5 ocupada por el aminoácido que ocupa la posición correspondiente en la cadena ligera del L2G7.

También se proporcionan las líneas celulares que producen tales anticuerpos humanizados. En otra modalidad, se proporciona una composición farmacéutica que incluye un mAb  
 10 L2G7 humanizado. En una tercera modalidad, la composición farmacéutica se administra a un paciente (un paciente humano típicamente) para tratar el cáncer u otra enfermedad.

#### **Breve Descripción de las Figuras**

15 Figura 1. Secuencias del aminoácido de las regiones variables de cadena pesada (A) y cadena ligera (B) maduras L2G7 transferidas de los cADNs clonados. Los CDRs se subrayan. Se usa el sistema de numeración Kabat.

Figura 2. Secuencias de aminoácidos de las regiones  
 20 variables de cadena pesada (A) y cadena ligera (B) maduras HuL2G7 que se muestran alineadas con las regiones del L2G7 y el aceptor V. Los CDRs se subrayan en las secuencias del L2G7, y los aminoácidos sustituidos con aminoácidos L2G7 de ratón en las secuencias HuL2G7, con el aminoácido H1E inicial  
 25 con subrayado doble.

Figura 3. Secuencias de aminoácidos de la totalidad de la cadena pesada (A) y la cadena ligera (B) HuL2G7. Los primeros aminoácidos de las cadenas maduras pesada y ligera (es decir, después de la segmentación de las secuencias de  
 30 señalización) se subrayan doblemente y se etiquetan con el número 1; estos aminoácidos también son los primeros

aminoácidos de las regiones maduras V. En la cadena pesada, se subrayan los primeros aminoácidos de las regiones CH1, bisagra, CH2 y CH3, y en la cadena ligera, se subraya el primer aminoácido de la región C<sub>k</sub>.

5       Figura 4. Una prueba competitiva de enlace del HuL2G7, ChL2G7 y L2G7 para enlazar el HGF.

Figura 5. La habilidad relativa del HuL2G7, ChL2G7 y L2G7 para bloquear el enlace del HGF con el Met.

Figura 6. La habilidad relativa del HuL2G7 y L2G7 para  
10 inhibir la proliferación del HGF inducido de las células Mv 1 Lu.

Figura 7. El efecto del tratamiento con el mAb del HuL2G7 o L2G7 o el control PBS sobre el crecimiento de los xenoinjertos subcutáneos U87 en los grupos de ratones NIH III  
15 beige/desnudos. La flecha indica cuándo comienzan las inyecciones, y las barras de error muestran el error estándar del significado (s.e.m.). Los símbolos para el L2G7 y el HuL2G7 se sobreponen y no pueden distinguirse en la Figura.

Figura 8. El efecto de cuatro niveles diferentes de  
20 dosis del HuL2G7 de los xenoinjertos subcutáneos U87 en los grupos de ratones NIH III beige/desnudos. La flecha indica cuándo comienzan las inyecciones, y las barras de error muestran el s.e.m.

### Descripción Detallada de la Invención

La invención proporciona anticuerpos monoclonales humanizados neutralizadores anti-HGF, composiciones farmacéuticas que los incluyen, y métodos de uso de éstos  
5 para el tratamiento de la enfermedad.

#### 1. Anticuerpos

Los anticuerpos son moléculas muy grandes y complejas (peso molecular de alrededor de ~150,000 o alrededor de 1320  
10 aminoácidos) con una estructura interna intrincada. Una molécula natural de anticuerpo contiene dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena pesada y una cadena ligera; de este modo la unidad fundamental de la estructura de un anticuerpo es un  
15 tetrámero. Cada cadena ligera y cada cadena pesada consiste en cambio de dos regiones: una región variable ("V"), implicada en el enlace del antígeno objetivo, y una región constante ("C"), que interactúa con otros componentes del sistema inmune. Las regiones de las cadenas ligera y variable  
20 se doblan sobre sí en un espacio tridimensional para formar una región variable que se enlaza al antígeno (por ejemplo, un receptor sobre la superficie de una célula). Dentro de cada región variable de la cadena ligera o pesada, existen tres segmentos cortos (promediando 10 aminoácidos en  
25 longitud), llamadas regiones de determinación de la complementariedad (CDRs, por sus siglas en inglés). Las seis CDRs en un dominio variable de anticuerpo (tres de la cadena ligera y tres de la cadena pesada) se doblan sobre sí en un espacio 3D para formar el lugar actual de enlace del  
30 anticuerpo que se cierra sobre el antígeno objetivo. La posición y longitud de las CDRs han sido definidas de manera

precisa. Ver Kabat et al., Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los E.U., 1983, 1987, que se incorpora aquí a manera de referencia. La parte de una región variable no contenida en las CDRs es llamada el marco abierto de lectura, el cual forma el medio ambiente para las CDRs. En cada cadena, las tres CDRs se dispersan de manera interna con cuatro secciones de marco abierto de lectura en este orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas maduras pesada y ligera de inmunoglobulina son designadas como Hx y Lx respectivamente, donde x es un número que designa la posición de un aminoácido, en conformidad con el esquema de Kabat, op. cit. Kabat enlista muchas secuencias de aminoácidos para los anticuerpos para cada subgrupo, y enlista los aminoácidos que aparecen de manera más común para cada posición de residuo en este subgrupo para generar una secuencia de consenso. Kabat usa un método para asignar un número de residuo a cada aminoácido en una secuencia enlistada, y este método para asignar número de residuo se ha convertido en un estándar en el campo. El esquema de Kabat es extensible a otros anticuerpos no incluidos en su compendio al alinear el anticuerpo con relación a una de las secuencias de consenso en Kabat como referencia a los aminoácidos conservados. El uso de los sistemas numéricos de Kabat identifican fácilmente los aminoácidos en las posiciones equivalentes en los diferentes anticuerpos. Por ejemplo, un aminoácido en la posición L50 de un anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a una posición L50 del aminoácido de un anticuerpo del ratón. Sin embargo, cualquiera de las dos secuencias de anticuerpos pueden ser alineadas de manera

única, por ejemplo, para determinar el porcentaje de identidad, usando el sistema numérico de Kabat de modo que cada aminoácido en una secuencia del anticuerpo se alinee con el aminoácido en la otra secuencia que tiene el mismo número de Kabat. Después de la alineación, si una región del anticuerpo del sujeto (por ejemplo, toda la región variable madura de una cadena pesada o ligera) se compara con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de la secuencia entre las regiones del anticuerpo del sujeto y la referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido en la región del anticuerpo del sujeto y de la referencia dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, sin contar los espacios, multiplicado por 100 para convertirlo en porcentaje.

Un anticuerpo monoclonal (mAb, por sus siglas en inglés) es una especie molecular única de anticuerpo y por lo tanto no abarca los anticuerpos policlonales producidos al inyectar a un animal (tal como un roedor, conejo o cabra) un antígeno, y extraer suero del animal. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo con ingeniería genética (monoclonal) en el que las CDRs de un anticuerpo del ratón ("anticuerpo donador", que puede ser también una rata, hámster u otras especies similares) se injertan en un anticuerpo humano ("anticuerpo aceptor"). Los anticuerpos humanizados también pueden ser producidos con menos de las CDRs completas de un anticuerpo del ratón (por ejemplo, Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002). De manera más común el primer bucle hiper-variable de cadena pesada H1, como se define por Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987, del anticuerpo donador, también es transferido al

anticuerpo humanizado. De este modo, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo con CDRs de un anticuerpo donador y marco abierto de lectura de la región variable y regiones constantes de los anticuerpos humanos. Los marcos abiertos de lectura de los aceptores de las cadenas pesada y ligera pueden ser de los mismos o diferentes anticuerpos humanos y pueden ser cada uno un compuesto de dos ó más marcos abiertos de lectura del anticuerpo humano; o ser alternativamente una secuencia de consenso de un grupo de marcos abiertos de lecturas humanos (por ejemplo, un subgrupo de anticuerpo humano como se define por Kabat et al., op. cit.), es decir, una secuencia con el aminoácido que aparece de manera más común dentro del grupo de cada posición. Además, para retener una alta afinidad de enlace, pueden ser empleados por lo menos uno ó dos elementos estructurales adicionales. Ver, Queen et al., nos. de Patente de E.U. 5,530,101 y 5,585,089, cada una de las cuales se incorporan aquí a manera de referencia, las cuales proporcionan instrucciones detalladas para la construcción de los anticuerpos humanizados.

20 En el primer elemento estructural, el marco abierto de lectura de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado se elige para tener una alta identidad de secuencia (por lo menos 65%) con el marco abierto de lectura de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo donador, al seleccionar de manera apropiada el anticuerpo aceptor de entre los muchos anticuerpos humanos conocidos. En el segundo elemento estructural, en la construcción del anticuerpo humanizado, los aminoácidos seleccionados en el marco abierto de lectura del anticuerpo aceptor humano (fuera de las CDRs) se reemplazan con los aminoácidos correspondientes del anticuerpo donador, en

30

conformidad con las reglas especificadas. Concretamente, los aminoácidos que son reemplazados en el marco abierto de lectura se eligen de manera general en base a su habilidad para interactuar con las CDRs. Por ejemplo, los aminoácidos reemplazados pueden estar adyacentes a una CDR en la secuencia del anticuerpo donador o dentro de 4-6 angstroms de una CDR en el anticuerpo humanizado, mientras se mide en el espacio tridimensional.

Por otra parte, puesto que los mAbs humanizados deben originarse con un mAb donador humano, los mAbs humanizados no abarcan mAbs esencialmente humanos hechos mediante el aislamiento de regiones variables que codifican ácidos nucleicos de un humano y su selección utilizando métodos de expresión fágica (ver, por ejemplo, Dower et al., WO91/17271; McCafferty et al., WO92/001047; Winter, WO92/20791; y Winter, FEBS Lett. 23:92, 1998) o al usar ratones transgénicos (ver, por ejemplo, Lonberg et al., WO93/12227; Kucherlapati WO91/10741, y Burgess et al. WO 2005/027107A2):

El epítipo de un mAb es la región de su antígeno al cual se enlaza el mAb. Dos anticuerpos se enlazan al mismo epítipo o al epítipo sobrepuesto si cada uno inhibe (bloquea) completamente el enlace del otro con el antígeno. Esto es, un exceso de 1x, 5x, 10x, 20x ó 100x de un anticuerpo inhibe el enlace del otro en por lo menos un 50%, pero preferentemente 75%, 90% o aún 99%, medido en una prueba competitiva de enlace (ver, por ejemplo, Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990). Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si todas las mutaciones del aminoácido en el antígeno que reducen o eliminan el enlace de un anticuerpo reducen o eliminan el enlace del otro. Dos anticuerpos tienen epítipos sobrepuestos si algunas

mutaciones del aminoácido que reducen o eliminan el enlace de un anticuerpo reducen o eliminan el enlace del otro.

## 2. Anticuerpos anti-HGF humanizados neutralizadores.

5 Un anticuerpo monoclonal (mAb, por sus siglas en inglés) que se enlaza al HGF (es decir, un mAb anti-HGF) debe neutralizar al HGF, o estar neutralizándolo, si el enlace inhibe parcial o completamente una o más actividades biológicas del HGF (es decir, cuando el mAb se usa como un  
10 agente único). Entre las propiedades biológicas del HGF que un anticuerpo neutralizador debe inhibir están la habilidad del HGF de enlazarse con su receptor c-Met, causar la dispersión de ciertas líneas celulares tales como las células de riñón canino Madin-Darby (MDCK, por sus siglas en inglés);  
15 estimular la proliferación (es decir, ser mitogénico) de ciertas células incluyendo los hepatocitos, las células epiteliales de pulmón de visón Mv 1 Lu, y varias células de tumores humanos; o estimular la angiogénesis, por ejemplo, como medida para la estimulación de la proliferación de la  
20 célula humana endotelial vascular umbilical (HUVEC, por sus siglas en inglés) o formación de tubo o por medio de la inducción de los vasos sanguíneos cuando se aplica a la membrana corioalantoica del embrión del pollo (CAM, por sus siglas en inglés). Los anticuerpos de la invención se enlazan  
25 preferentemente con el HGF humano, es decir, con la proteína codificada por la secuencia del GenBank con el número de Ascensión D90334.

Un mAb humanizado neutralizador de la invención en una concentración de, por ejemplo, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10,  
30 20 ó 50  $\mu\text{g/ml}$  inhibirá una función biológica del HGF (por ejemplo, la estimulación de la proliferación o dispersión) en

alrededor de por lo menos un 50%, pero preferentemente un 75%, más preferentemente un 90% ó un 95% o aún un 99%, y de manera más preferible aproximadamente un 100% (esencialmente por completo), como se probó con los métodos descritos más

5 abajo en el título Ejemplos o con los conocidos en el arte. Típicamente, la extensión de la inhibición se mide cuando la cantidad de HGF usado es sólo suficiente para estimular completamente la actividad biológica, o es de 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 3, ó 10  $\mu\text{g/ml}$ . Preferentemente, se logrará

10 por lo menos un 25%, 50%, 75%, 90%, ó 95% o la inhibición esencialmente completa cuando la relación molar del anticuerpo del HGF es de 0.1x, 0.5x, 1x, 2x, 3x, 5x, ó 10x. De manera más preferible, el mAb neutralizará no sólo una, sino varias de las actividades biológicas listadas

15 anteriormente; para los propósitos descritos, un mAb anti-HGF que neutraliza todas las actividades biológicas del HGF será llamado "neutralizador total", y tales mAbs son los más preferidos. Los mAbs de la invención preferentemente se enlazan de manera específica con el HGF, esto es, estos no se

20 enlazarán, o se enlazarán a una extensión mucho menor, de proteínas que se relacionan con el HGF tales como el factor de crecimiento del fibroblasto (FGF, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés). Los mAbs de la invención tienen

25 comúnmente una afinidad de enlace ( $K_a$ ) con el HGF de por lo menos  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , pero preferentemente de  $10^8 \text{ M}^{-1}$  ó más, y de manera más preferente de  $10^9 \text{ M}^{-1}$  ó más, o aún  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  ó más.

Los mAbs humanizados de la invención incluyen anticuerpos anti-HGF en su forma tetramérica natural (2

30 cadenas ligeras y 2 cadenas pesadas) y pueden ser de cualquiera de los isotipos conocidos IgG, IgA, IgM, IgD e IgE

y sus subtipos, es decir, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y pueden incluir una cadena ligera lambda o kappa. Los mAbs de la invención también incluyen fragmentos de anticuerpos tales como Fv, Fab y F(ab')<sub>2</sub>; anticuerpos híbridos bifuncionales (por ejemplo, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987), anticuerpos de cadena única (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988; Bird et al., Science 242:423, 1988); y anticuerpos con regiones constantes alteradas (por ejemplo, Patente de E.U. No. 5,624,821). La fuente de las CDRs del mAb puede ser de origen animal (por ejemplo, de ratón, rata, hámster o pollo), o puede ser modificada con ingeniería genética. Los mAbs de roedor son producidos por métodos estándar bien conocidos en el arte, incluyendo la inmunización múltiple con HGF en un adyuvante apropiado i.p., i.v., o dentro de una almohadilla para cultivo, seguido de la extracción de células nodo de bazo o de glándula linfática y la fusión con una línea de células inmortalizadas apropiadas, y entonces la selección de la hibridoma que produce el anticuerpo que se enlaza al HGF.

La invención proporciona formas humanizadas del mAb L2G7 de ratón. Las secuencias de las regiones variables maduras de la cadena pesada y ligera del mAb L2G7 de ratón se muestran en la Figura 1A y 1B respectivamente. De este modo, las formas humanizadas del mAb L2G7 abarcan la mayoría o todos los aminoácidos de la CDR a partir de estas secuencias en los marcos abiertos de lectura humanos de la región variable (incluyendo los marcos abiertos de lectura humanos de secuencia única, compuesta o consensada). Por ejemplo, algunos anticuerpos humanizados incluyen tres CDRs intactas de la cadena pesada del L2G7 y tres CDRs intactas de la cadena ligera. Otros anticuerpos humanizados incluyen por lo

menos una CDR intacta de la cadena pesada del L2G7 y por lo  
menos una CDR intacta de la cadena ligera del L2G7. Algunos  
anticuerpos humanizados incluyen por lo menos una CDR en la  
cual algunos residuos son de la CDR correspondiente del L2G7  
5 y los otros son de una CDR de un anticuerpo humano,  
preferentemente del mismo anticuerpo humano que suministra el  
marco abierto de lectura de la región variable que contiene  
la CDR.

En algunos anticuerpos humanizados de la invención, por  
10 lo menos 1, 3, 5 ó todas las posiciones seleccionadas del  
grupo de H29, H30, H48, H66, H67, H71, H94, L3 y L60 se  
ocupan por un aminoácido presente en la posición  
correspondiente en la numeración de Kabat en el anticuerpo  
L2G7 de ratón. En los marcos abiertos de lectura de la región  
15 variable del aceptor humano usados en los Ejemplos, todas  
estas posiciones son ocupadas por residuos humanos que  
difieren del aminoácido presente en la posición  
correspondiente en el anticuerpo L2G7 de ratón. De este  
modo, es preferible sustituir todas o la mayoría de las  
20 posiciones seleccionadas del grupo. Si se utilizan otros  
marcos de lectura abiertos humanos de la región variable,  
algunas de las posiciones pueden ser ocupadas por los  
aminoácidos que son los mismos en el marco abierto de lectura  
humano de la región variable y en el anticuerpo L2G7 de  
25 ratón. En conformidad, la sustitución no se realiza en tales  
posiciones, pero puede ser realizada en otras posiciones que  
difieren de entre el marco abierto de lectura humanos de la  
región variable y el anticuerpo L2G7 de ratón, en conformidad  
con las reglas de Queen, E.U. 5,530,101 y E.U. 5,585,089. A  
30 pesar de la elección del marco abierto de lectura humano de  
la región variable, la sustitución de otros aminoácidos

además de aquellos especificados dentro del grupo anterior también es posible como se describe más adelante. Sin embargo, en general, ni el marco abierto de lectura de la región variable de la cadena pesada, ni el marco abierto de lectura de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado, incluye más de diez o doce sustituciones resultando en residuos no presentes en el marco abierto de lectura de la región variable del aceptor humano (incluyendo los marco abierto de lecturas humanos de la región variable de consenso y los marco abierto de lectura humanos de la región variable compuesta, como se describe anteriormente).

Cualquier región constante presente en los anticuerpos humanizados de la invención son humanos o esencialmente humanos, sin tener más de diez, y preferentemente dos ó menos sustituciones relativas a una región humana constante natural. Algunas sustituciones son benéficas en el aumento de la vida media de un anticuerpo y/o en su afinidad con el FcγRn, como se describe más adelante. Otras sustituciones, normalmente sustituciones conservativas, como se describe más adelante, tienen un efecto neutral.

Formas humanizadas ejemplificadas del L2G7 incluyen regiones variables maduras de cadenas pesada y ligera con las secuencias mostradas en las Figuras 2A y 2B respectivamente. Otras formas preferidas de L2G7 humanizados incluyen regiones variables maduras de cadenas pesada y ligera con secuencias idénticas en un 90%, 95%, 98% ó 99% a estas secuencias (cuando se alinean en conformidad con la numeración de Kabat, supra), y/o difieren de estos por un número pequeño (implicando típicamente no más de 5 ó 10 aminoácidos) de las sustituciones, supresiones y/o inserciones inconsecuentes

funcionalmente. Por ejemplo, el primer aminoácido de la cadena pesada puede ser Glu o Gln. Las sustituciones son usualmente conservativas, esto es que reemplazan un aminoácido con uno que es químicamente similar. Para

5 propósitos de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos pueden ser agrupados de la siguiente manera: Grupo I (cadenas hidrofóbicas): Met, Ala, Val, Leu, Ile; Grupo II (cadenas hidrofílicas neutrales): Cys, Ser, Thr; Grupo III (cadenas

10 acídicas): Asp, Glu,; Grupo IV (cadenas básicas): Asn, Gln, His, Lys, Arg; Grupo V (residuos que influyen la orientación de la cadena): Gly, Pro; y Grupo VI (cadenas aromáticas): Trp, Tyr, Phe. Las sustituciones conservativas son aquellas que implican sustituciones entre aminoácidos en

15 el mismo grupo. Las sustituciones relacionadas con las regiones V en las Figuras 2A y 2B son evitadas preferentemente en las posiciones H29, H30, H48, H66, H67, H71, H94, L3 y L60, en las que los aminoácidos del L2G7 de ratón se incluyen debido a la interacción de estas posiciones

20 con las CDRs, como se describe en los Ejemplos. Las sustituciones ocurren preferentemente en las posiciones del marco abierto de lectura de la región variable, pero también pueden ocurrir en las regiones de la CDR. Si una región de la CDR se sustituye, es preferible reemplazar un aminoácido de

25 ratón con un aminoácido de la posición correspondiente (numeración de Kabat) de un anticuerpo humano, preferentemente el mismo anticuerpo humano que suministra los marcos abiertos de lectura de la región variable del aceptor.

Usualmente, los mAbs L2G7 humanizados son del isotipo

30 IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 con una cadena ligera kappa. Un mAb IgG1 con las regiones variables de las Figuras 2A y 2B

respectivamente combinadas con toda la región humana constante kappa y gamma-1 se designan HuL2G7. Las cadenas completas pesada y ligera del HuL2G7 se muestran de manera correspondiente en las Figuras 3A y 3B. Sólo las partes  
 5 maduras de estas secuencias que comienzan en las posiciones indicadas por el número 1 constituyen realmente el HuL2G7, mientras los péptidos precedentes de señalización se separan antes o durante la secreción del anticuerpo.

Variantes del HuL2G7 que conservan características  
 10 similares de enlace con el HuL2G7 pueden obtenerse por la mutagénesis seguida de la selección de la masa usando los métodos de expresión en fago descritos anteriormente. Las variantes son seleccionadas inicialmente para enlazar específicamente al HGF, opcionalmente en competencia con el  
 15 HuL2G7 o el L2G7 de ratón. Las variantes con las mismas o similares características de enlace, como el anticuerpo ejemplificado, pueden entonces ser probadas funcionalmente.

Los mAbs L2G7 humanizados preferidos son neutralizadores o totalmente neutralizadores del HGF como se  
 20 define *supra*. Preferentemente, para algunas, la mayoría o todas las propiedades biológicas del HGF medidas (por ejemplo, el enlace con el Met, la estimulación de la proliferación de las Mv 1 Lu ó las células HUVEC), la actividad de neutralización del mAb humanizado está dentro de  
 25 3 veces, más preferentemente de 2 veces ó 1.5 veces, y de manera más preferible es indistinguible (es decir, dentro del error experimental) de la actividad neutralizadora del L2G7 por sí misma. Esto es, no más de 3 veces, 2 veces, 1.5 veces ó la misma cantidad de mAb humanizados, con respecto al L2G7,  
 30 se necesitan para obtener la misma extensión de inhibición de la propiedad biológica (por ejemplo, medido por IC50's).

Preferentemente, la afinidad para el HGF de los mAbs humanizados también está dentro de 3 veces, 2 veces o es esencialmente indistinguible de aquel del L2G7. De manera similar, en los modelos de xenoinjerto de ratón (por ejemplo, usando una línea de célula humana de glioma tal como la U87), los mAbs humanizados preferentemente inhiben el crecimiento del tumor dentro de 3 veces, 2 veces o es indistinguible del mAb L2G7 de ratón. En efecto, preferentemente sólo una dosis de 40, 20 ó 10  $\mu$ g de mAb humanizado administrada dos veces por semana inhibe completamente el crecimiento del xenoinjerto del tumor U87.

Los mAbs humanizados pueden ser expresados por una variedad de métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, los genes que codifican sus regiones V de las cadenas pesada y ligera pueden ser los primeros sintetizados a partir de los oligonucleótidos sobrepuestos o por la mutagénesis de PCR de una variante antes preparada del gen deseado. Debido a la degeneración del código genético, una variedad de secuencias de ADN codifican cada secuencia de aminoácido del anticuerpo. Todas las secuencias de ADN que codifican los anticuerpos descritos en esta solicitud se incluyen de manera expresa en la invención. Como se halla hecho, los genes codifican los genes de las cadenas pesada y ligera del mAb humanizado y se insertan en conjunto con las regiones C dentro de los vectores de expresión (por ejemplo, disponibles de manera comercial de Invitrogen) que proporciona las regiones regulatorias necesarias, por ejemplo, promotores, resaltadores, sitios poli-A, etc. Se prefiere el uso del promotor-resaltador del CMV. Los genes para las regiones C están ampliamente disponibles ahora o pueden ser clonadas fácilmente por medio de PCR a partir del anticuerpo humano

que produce células. Los genes de cadenas pesada y ligera pueden ser insertados juntos en un vector único o en vectores separados. Los vectores de expresión pueden entonces ser transfectados utilizando varios métodos conocidos en el arte tales como la lipofección o la electroporación en una variedad de líneas de células mamíferas tales como CHO o 293 o mielomas no productoras que incluyen Sp2/0 y NS0, y células que expresan los anticuerpos seleccionados por la selección antibiótica natural. Ver, por ejemplo, la Patente de E.U. No. 5,530,101. Mayores cantidades de anticuerpos pueden ser producidas al hacer crecer las células en bioreactores comercialmente disponibles.

Una vez expresados, los mAbs humanizados de la invención pueden ser purificados en conformidad con procedimientos estándar del arte tales como la microfiltración, la ultrafiltración, la cromatografía por afinidad de la proteína A o G, la cromatografía por exclusión por tamaño, la cromatografía por intercambio de aniones, la cromatografía por intercambio de cationes y/u otras formas de cromatografía por afinidad en base a tintes orgánicos o parecidos. Se prefieren anticuerpos sustancialmente puros de por lo menos un 90 ó 95% de homogeneidad, para usos farmacéuticos se prefiere más un 98% ó 99% ó más de homogeneidad.

25

### 3. Métodos terapéuticos.

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que incluye los anticuerpos humanizados descritos aquí. Las formulaciones farmacéuticas de los anticuerpos contienen al mAb en un portador fisiológicamente aceptable, opcionalmente con

30

excipientes o estabilizadores, en la forma de soluciones acuosas o liofilizadas. Los portadores aceptables, excipientes o estabilizadores, no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato o acetato con un pH típicamente de 5.0 a 8.0, más a menudo de 6.0 a 7.0; sales tales como el cloruro de sodio, cloruro de potasio, etc. para hacer isotónicos; antioxidantes, preservadores polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas, polímeros hidrofílicos tales como el polisorbato 80, aminoácidos, carbohidratos, agentes quelantes, azúcares, y otros ingredientes estándar conocidos por aquellos con habilidad en el arte (ver, Remington's Pharmacuetical Science 16th edition, Osol, A. Ed. 1980). El mAb se encuentra presente de manera típica en una concentración de 1 - 100 mg/ml, por ejemplo, 10 mg/ml.

En otra modalidad preferida, la invención proporciona un método de tratar a un paciente con una enfermedad usando un mAb anti-HGF humanizado, tal como el L2G7 humanizado, por ejemplo, el HuL2G7, en una formulación farmacéutica. El mAb preparado en una formulación puede ser administrado a un paciente por medio de cualquier ruta apropiada especialmente de manera parental por una infusión intravenosa o una inyección en bolo, de manera intramuscular o subcutánea. La infusión intravenosa puede darse durante un periodo tan corto como 15 minutos, pero más a menudo durante 30 minutos, o aún durante 1, 2 ó 3 horas. El mAb también puede ser inyectado directamente en el lugar de la enfermedad (por ejemplo, un tumor), o encapsulado dentro de agentes portadores tales como los liposomas. La dosis dada es suficiente para aliviar la condición a tratar ("dosis terapéutica efectiva") y es más

probable que sea de 0.1 a 5 mg/kg de peso del cuerpo, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 mg/kg, pero puede ser tan alta como 10 mg/kg o aún 15 ó 20 mg/kg. Una unidad fija de dosis también puede ser administrada, por ejemplo, 50, 100, 200, 500 o 1000 mg, o la dosis puede estar basada en el área superficial del paciente, por ejemplo, 100 mg/m<sup>2</sup>. Usualmente entre 1 y 8 dosis (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) se administran para tratar el cáncer, pero 10, 20 o más dosis pueden ser administradas. El mAb puede ser administrado diariamente, dos veces por semana, semanalmente, quincenalmente, mensualmente o con algún otro intervalo, dependiendo, por ejemplo, de la vida media del mAb, durante 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas, 3-6 meses o más. También son posibles cursos repetidos de tratamiento, como la administración crónica.

Las enfermedades especialmente susceptibles a la terapia con los mAbs de HGF humanizados de esta invención, por ejemplo, el HuL2G7, incluyen tumores sólidos que se cree requieren de la angiogénesis para ser asociados con niveles elevados del HGF, por ejemplo, cáncer de ovarios, de seno, de pulmón (de célula pequeña o de célula no pequeña), de colon, de próstata, de páncreas, gástrico, del hígado, tumores en la cabeza-cuello, melanomas y sarcomas de niños o adultos, y tumores cerebrales. Claro está, los métodos de esta invención, especialmente el tratamiento sistémico con un mAb L2G7 humanizado, son especialmente aplicables para el tratamiento de tumores cerebrales que incluyen meningiomas; gliomas que incluyen ependinomas, oligodendrogliomas, y todos los tipos de astrocitomas (de bajo grado, anaplásicos, y glioblastomas multiformes o glioblastomas simples); meduloblastomas, gangliogliomas, schwannomas, cordomas; y tumores cerebrales principalmente de niños que incluyen

tumores neuroectodérmicos primitivos. Los tumores cerebrales primarios (es decir, los que nacen en el cerebro) y los tumores cerebrales secundarios o metastáticos pueden ser tratados por los métodos de la invención. Otras enfermedades apropiadas para el tratamiento con los métodos de la invención son aquellos asociados con la angiogénesis no deseada, tal como la retinopatía diabética, la degeneración macular relacionada con la edad, la artritis reumatoide y la psoriasis.

En una modalidad especialmente preferida, el mAb anti-HGF humanizado, por ejemplo, el HuL2G7, se administra en conjunto con (es decir, antes, durante o después) otra terapia anticáncer. Por ejemplo, el mAb puede ser administrado en conjunto con cualquiera de una o más de las múltiples drogas quimioterapéuticas conocidas por aquellos con habilidad en el arte de la oncología, por ejemplo, agentes de alquilación, tales como la carmustina, clorambucilo, cisplatino, carboplatino, oxiplatino, procarbazona, y ciclofosfamida; antimetabolitos tales como el fluorouracilo, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, metotrexato e hidroxiurea; productos naturales incluyendo los alcaloides y antibióticos botánicos tales como la bleomicina, doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, etoposido, mitomicina, mitoxantrona, vinblastina, vincristina, y Taxol (paclitaxel) o compuestos relacionados tales como el Taxotere®; agentes aprobados específicamente para los tumores cerebrales que incluyen la temozolamida y obleas de Gliadel® que contienen carmustina; u otras drogas que incluyen irinotecan y Gleevec® y todos los agentes anticáncer aprobados y experimentales listados en el documento WO 2005/017107 A2 (que se incorpora aquí a manera de

referencia). Otros agentes con los cuales puede ser administrado el mAb anti-HGF humanizado incluyen agentes biológicos tales como los anticuerpos monoclonales, incluyendo el Herceptin® contra el antígeno HER2, el Avastin®  
 5 contra el VEGF, o anticuerpos para el receptor del EGF. Así como también las drogas anti-angiogénicas de molécula pequeña o antagonistas del receptor del EGF. Además, el mAb anti-HGF humanizado puede ser usado en conjunto con la terapia de radiación o la cirugía.

10 El tratamiento (por ejemplo, la quimioterapia estándar) que incluye al anticuerpo mAb anti-HGF humanizado, por ejemplo, al HuL2G7, puede incrementar el tiempo medio de supervivencia sin progreso o el tiempo total de supervivencia de los pacientes con estos tumores (por ejemplo, de ovarios,  
 15 de seno, de pulmón, de páncreas, de cerebro y de colon, especialmente cuando recaen o retraen) en por lo menos un 30% ó 40%, pero de manera preferida un 50%, 60% a 70% o aún 100% o más, en comparación con el mismo tratamiento (por ejemplo, quimioterapia), pero sin el mAb anti-HGF. Además o de manera  
 20 alternativa, el tratamiento (por ejemplo, la quimioterapia estándar) que incluye el mAb anti-HGF puede incrementar la tasa total de respuesta, la tasa parcial de respuesta, o la tasa objetivo de respuesta (total + parcial), de los pacientes con estos tumores (por ejemplo, de ovario, de seno,  
 25 de pulmón, de páncreas, de cerebro y de colon, especialmente cuando recaen o retraen), en por lo menos un 30% ó 40%, pero preferentemente un 50%, 60% a 70% o aún en un 100%, en comparación con el mismo tratamiento (por ejemplo, quimioterapia), pero sin el mAb anti-HGF. Para los tumores  
 30 cerebrales tales como los glioblastomas, el tratamiento con el mAb anti-HGF humanizado, sólo o en combinación con otros

agentes, provee de manera preferida una tasa parcial, total u objeto de respuesta de por lo menos un 5% ó 10%, más preferentemente un 20% ó un 25% ó un 30% y de manera más preferida un 40%, un 50% ó más.

- 5 Típicamente, en una prueba clínica (por ejemplo, una prueba de fase II, fase II/III o fase III), lo antes mencionado aumenta la supervivencia media sin progreso y/o la tasa de respuesta de los pacientes tratados con la terapia estándar más el mAb anti-HGF humanizado, por ejemplo, el
- 10 HuL2G7, con relación al grupo de control de pacientes que reciben sólo la terapia estándar (o más un placebo), que son estadísticamente significativos, por ejemplo en el nivel  $p = 0.05$  ó  $0.01$  o aún  $0.001$ . Las tasas totales y parciales de respuesta son determinadas por el criterio objetivo, usado
- 15 comúnmente en pruebas clínicas para el cáncer, por ejemplo, como se enlistan o aceptan por el Instituto Nacional del Cáncer (de E.U.) y/o la Administración de Alimentos y Medicinas (de E.U.).

20

#### 4. Otros métodos

- Los mAbs anti-HGF humanizados de la invención también tienen uso en los métodos de diagnóstico, pronóstico y de laboratorio. Pueden ser usados para medir el nivel del HGF en un tumor o en la circulación de un paciente con un tumor, y
- 25 por consiguiente en el seguimiento y manejo del tratamiento del tumor. Por ejemplo, un tumor asociado con altos niveles del HGF sería especialmente susceptible de ser tratado con un mAb anti-HGF humanizado. En modalidades particulares, los mAbs pueden ser usados en un ELISA o una prueba radio-
- 30 inmunológica para medir el nivel del HGF, por ejemplo, en un espécimen de biopsia de tumor o en suero o en medios

supernatátiles de las células que secretan el HGF en el cultivo celular. Para varias pruebas, el mAb anti-HGF puede ser etiquetado con moléculas fluorescentes, moléculas etiquetadas por giro, encimas o radioisotipos, y pueden ser provistos en forma de equipo con todos los reactivos necesarios para realizar la prueba del HGF. En otros usos, los mAbs anti-HGF se utilizan para purificar el HGF, por ejemplo, por afinidad cromatográfica.

10

## EJEMPLO

## 1. Construcción de un anticuerpo humanizado L2G7

La generación del mAb L2G7 anti-HGF de ratón, que neutraliza todas las actividades biológicas probadas del HGF, ya ha sido descrito (Kim et al., US20050019327, presentada el 13 de Agosto del 2004, y Kim et al. Clin. Cancer Res. 12:1292, 2006). El primer paso para humanizar el L2G7 fue clonar sus genes de cadena pesada y ligera, lo cual fue complementado esencialmente en conformidad con el método de Co et al., J. Immunol. 148:1149, 1992. Brevemente, se preparó ARN de  $10^6$  células de L2G7 (IgG2a, K) de hibridoma, usando un Mini Kit RNeasy (Qiagen), seguido de una síntesis del primer filamento del cADN con cebadores aleatoriamente, utilizando un equipo de Stratagene y la adición de colas dG con deoxinucleotidil transferasa terminal (Promega). Las regiones V de cadena pesada y ligera fueron amplificadas respectivamente a partir del cADN con una primera alineación con las colas dG y una alineación del cebador con la región N-terminal del C<sub>y2a</sub> para la cadena pesada y una alineación del cebador para la región N-terminal del C<sub>K</sub> para la cadena ligera, utilizando una polimerasa de alta fidelidad AccuPrime Pfx (Invitrogen). Las bandas de tamaños apropiados fueron

purificadas por gel, a partir de las reacciones PCR, y  
 secuenciadas directamente o clonadas y entonces secuenciadas,  
 usando el método de dideoxi de terminación con un  
 secuenciador automatizado. Una secuencia de cADN única se  
 5 encontró para la cadena pesada, que se muestra después del  
 traslado en la Figura 1A. Se encontraron dos secuencias no  
 aberrantes de cADN de cadena ligera, pero la secuenciación  
 del aminoácido de la N-terminal de la cadena ligera aislada  
 del L2G7 reveló sólo una de estas cadenas, siendo mostrada la  
 10 secuencia de aminoácido trasladada en la Figura 1B.

Para expresar una forma quimérica del L2G7 y después el  
 mAb humanizado, los vectores de expresión similares a los  
 vectores pVk y pVgl descritos en Co et al., J. Immunol.  
 148:1149, 1992, que contiene los genes humanos  $C_K$  y  $C_{\gamma 1}$ , se  
 15 construyeron a partir de vectores comercialmente disponibles  
 y fragmentos de ADN. Sin embargo, el vector de la cadena  
 ligera tiene el marcador elegible *hyg* en lugar del *gpt*, y el  
 vector de la cadena pesada tiene el marcador elegible *neo* en  
 lugar del *Dhfr*. Los genes clonados  $V_L$  y  $V_H$  se sub-clonaron en  
 20 los lugares apropiados de estos vectores para generar  
 plásmidos de expresión para los genes de cadena pesada y  
 ligera del mAb L2G7 quimérico (chL2G7). El mAb chL2g7 fue  
 producido y mostrado para enlazar al HGF, así como lo hace el  
 L2G7 también. Proporcionando que han sido clonadas regiones V  
 25 de cadena pesada y ligera correctas.

Para diseñar un mAb L2G7 humanizado, se siguieron de  
 manera general los métodos de Queen et al., Patentes de E.U.  
 Nos. 5,530,101 y 5,585,089. La base de datos del Centro  
 Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus  
 30 siglas en inglés) de las secuencias del anticuerpo humano  
 fueron escaneadas, y la secuencia VH AAC18323 humana y la

secuencia BAC01726 humana se eligieron de manera correspondiente para servir como secuencias del aceptor para las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  del L2G7, debido a que estas tienen una homología del marco abierto de lectura particularmente alta (es decir, la identidad de secuencia) con estas. Un programa computacional, Deep View Swiss-Pdb Viewer, disponible en la red mundial (<http://www.expasy.org/spdbv>), se usó para construir un modelo molecular del dominio variable del L2G7, el cual fue usado para localizar los aminoácidos en el marco abierto de lectura del L2G7 que están lo suficientemente cerca a las CDRs para interactuar de manera potencial con estas. Para diseñar las regiones variables de cadena pesada y ligera del L2G7 humanizado, las CDRs el mAb L2G7 de ratón fueron injertadas primero de manera conceptual en las regiones del marco abierto de lectura del aceptor. En las posiciones del marco abierto de lectura donde el modelo computacional sugirió un contacto importante con las CDRs, las cuales pueden ser necesitadas para mantener la conformación de la CDR, los aminoácidos del anticuerpo de ratón fueron sustituidos por los aminoácidos de marco abierto de lecturas humanos originales. Para el mAb L2G7 humanizado, designado como HuL2G7, esto se realizó en los residuos 29, 30 (dentro del bucle de hiper-variable de Chothia H1), 48, 66, 67, 71 y 94 de la cadena pesada, y en los residuos 3 y 60 de la cadena ligera, usando la numeración de Kabat. Además, el aminoácido 1 de la cadena pesada se reemplazó con E (Glu), debido a que este aminoácido es menos probable que Q (Gln) de experimentar la derivación en la proteína del anticuerpo. Las secuencias de la región V de la cadena pesada y ligera del HuL2G7 se mostraron alineadas hacia el L2G7 correspondiente y las regiones V del aceptor en las Figuras 2A y 2B, con las

CDRs y los aminoácidos sustituidos realzados.

La invención también proporciona mAbs L2G7 humanizados variantes cuyas regiones maduras variables de cadenas pesada y ligera difieren de las secuencias del HuL2G7 por un pequeño  
5 número (por ejemplo, típicamente no más de 1, 2, 3, 5 ó 10) de reemplazos, supresiones o inserciones, usualmente en el marco abierto de lectura, pero posiblemente en las CDRs. En particular, sólo un subgrupo de sustituciones descritas anteriormente pueden ser hechas en los marco abierto de  
10 lecturas del aceptor, o pueden realizarse sustituciones adicionales, por ejemplo, el aminoácido 69F V<sub>H</sub> del L2G7 de ratón puede reemplazar al aminoácido 69M del aceptor. Por otra parte, el aminoácido 1E V<sub>H</sub> puede ser Q en cambio. Claramente, muchos de los residuos del marco abierto de  
15 lectura que no están en contacto con las CDRs en el HuL2G7 pueden acomodar sustituciones de aminoácidos a partir de las posiciones correspondientes del L2G7 u otros anticuerpos humanos o de ratón, e inclusive muchos residuos potenciales en contacto con las CDRs también son de fácil sustitución e  
20 inclusive aminoácidos dentro de las CDRs.

La mayoría de la veces los reemplazos hechos en las secuencias variantes del L2G7 humanizado son conservativas con respecto a los aminoácidos reemplazados del HuL2G7. Preferentemente, los reemplazos en el HuL2G7 (conservativas o  
25 no), no tienen efecto sustancial en la afinidad o potencia de enlace del mAb humanizado, esto es, su habilidad para neutralizar las actividades biológicas del HGF (por ejemplo, la potencia en algunos o todas las pruebas descritas aquí del mAb variante del L2G7 humanizado es esencialmente la misma,  
30 es decir, dentro del error experimental, como aquel del HuL2G7). Preferentemente, las secuencias de la región V

variable madura de cadena pesada y ligera son idénticas por lo menos en un 90%, de manera más preferida por lo menos en un 95%, y de la manera más preferida por lo menos en un 98%, a las regiones maduras de cadena pesada y ligera del HuL2G7.

5 De manera alternativa, otras regiones variables del anticuerpo humano con alta identidad de la secuencia con aquellas del L2G7 también son apropiadas para suministrar el marco abierto de lectura del anticuerpo humanizado, especialmente las regiones V kappa del subgrupo humano I y  
10 las regiones V de cadena pesada del subgrupo humano I, o las secuencias de consenso de estos subgrupos.

El mAb HuL2G7 ejemplar, descrito en los Ejemplos a continuación, tiene regiones constantes K y y1 y es, por lo tanto, un IgG1: las secuencia completas de los genes HuL2G7  
15 de cadena pesada o ligera que incluyen péptidos de señalización se muestran en las Figuras 3A y 3B. (Por supuesto, los péptidos de señalización son separados y no son parte del HuL2G7). Sin embargo, se entiende que los mAbs IgG1 de otros alotipos (IgG1, K) son abarcados por la designación  
20 HuL2G7. Los mAbs humanizados de otros isotipos (por ejemplo, IgG2, IgG3 e IgG4) pueden ser producidos al combinar las regiones variables del HuL2G7 con las regiones constantes humanas apropiadas. Los reemplazos pueden ser hechos en las regiones constantes del HuL2G7 para reducir o incrementar la  
25 función del efector, tal como la citotoxicidad complementada-mediada o ADCC (ver, por ejemplo, Winter et al., Patente de E.U. No. 5,624,821; Tso et al., Patente de E.U. No. 5,834,597; y Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), o para prolongar la vida media en los  
30 humanos (ver, por ejemplo, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Específicamente, pero sin limitar, el HuL2G7

con mutaciones en la región constante del IgG, con un Gln en la posición 250 y/o un Leu en la posición 428, son modalidades de la presente invención.

Habiendo diseñado el mAb HuL2G7, es decir, habiendo  
5 elegido las secuencias de aminoácido de sus regiones V de cadena pesada y ligera (Figura 2 y Figura 3), las secuencias de ADN que codifican las regiones V (incluyendo péptidos de señalización) fueron elegidas de manera rutinaria por medio del código genético; las secuencias comenzaron con  
10 CTGGAGACCACC antes del codón inicializador ATG para proveer un sitio de restricción para la clonación y una señalización de la inicialización de la translación de Kozak. Estos genes fueron sintetizados de manera comercial por Genscript Corp. (Piscataway, NJ). De manera alternativa, el método de Co et  
15 al., J. Immunol. 148:1149, 1992, puede ser usado para sintetizar cada gen de la región V. Brevemente, se sintetizan dos pares de oligonucleótidos superpuestos en filamentos alternativos (sintetizador de ADN de Applied Biosystems), que en conjunto abarcan al gen entero. Los oligonucleótidos son  
20 de 110 a 140 bases de largo con la superposición de 15 bases. Fragmentos de ADN de doble filamento se sintetizan usando polimerasa de Klenow del par 5' y del par 3' de oligos, separadamente. El fragmento 5' de ADN es segmentado con las enzimas de restricción cortando el extremo 5' y el centro del  
25 gen de la región V. El fragmento 3' de ADN es segmentado con las enzimas de restricción cortando el centro y el extremo 3' del gen de la región V. Cada fragmento segmentado se inserta en un vector apropiado de clonado y se transforma en *E. coli*, y se secuencian ADN a partir de una cantidad de disociaciones  
30 para encontrar fragmentos que hayan corregido de manera completa las secuencias. Para cada gen, se realiza entonces

una ligadura de 3 vías para insertar los fragmentos 5' y 3' correctos en el vector de expresión apropiado para formar el gen completo, secuencia del cual es verificada.

Producir el mAb HuL2G7, se cultivaron las células 293-F 5 epiteliales renales humanas (Invitrogen) en un medio de expresión FreeStyle 293 (medio FS; Invitrogen) y re-suspendidas en un medio FS de 106 células /2 ml /macrowell. Los ADNs de vector de expresión de cadena pesada y ligera del HuL2G7 (1  $\mu$ g de cada uno) se incubaron con 3  $\mu$ l de Eugene 6 10 (Roche) en 100  $\mu$ l de medio FS durante 30 minutos en RT; la mezcla entonces fue añadida a las células. Después de una incubación de 48 hrs., las células transfectadas fueron cultivadas en presencia de 1 mg/ml de G418 para seleccionar las células que expresan el neo y entonces dispersarlas en 15 placas de cultivo de tejido de 96 pozos (100  $\mu$ l/pozo). Después de aproximadamente 2 semanas, cuando los pozos que contienen células viables se han hecho confluentes, fueron probados los supernatátiles cultivados a partir aquellos pozos en la presencia y cantidad del HuL2G7 por medio de 20 ELISA. Las células transfectadas pueden encubrir un desbalance de cadenas pesada y ligera, de modo que se asegure que solo se mida el HuL2G7 completo, esta ELISA utiliza un Fc anti-humano de cabra como un agente de captura y un kappa anti-humano biotinilado como reactivo de detección. El mAb 25 chL2G7 fue expresado de manera similar. Clones de las células que expresan niveles relativamente altos de ChL2G7 y HuL2G7 fueron expandidos y desarrollados respectivamente en un medio FS. El anticuerpo fue purificado a partir del cultivo de supernatátiles usando la cromatografía de afinidad de 30 proteína A y analizado en pureza por medio de la SDS-PAGE.

## 2. Propiedades del HuL2G7

Para comparar la afinidad de enlace del HuL2G7 con aquella del ChL2G7 y del L2G7, se realizó un experimento de enlace competitivo. Se cubrió una placa microtiter con 50  $\mu$ l/pozo de 2  $\mu$ g/ml de IgG-Fc (GahlgG-Fc) anti-humano de cabra en PBS durante 1 noche a 4 °C y bloqueada con 2% de BSA durante 1 hora en RT. Después del lavado, la placa se incubó con 50  $\mu$ l/pozo de mAb ChL2G7 (2  $\mu$ g/pozo) durante 1 hora en RT, seguido del lavado por 50  $\mu$ l/pozo de IgG humano (10  $\mu$ g/ml) durante 1 hora para reducir el antecedente. Después de los lavados, los pozos de la placa fueron incubados de manera separada durante 1 hora con 50  $\mu$ l/pozo de varias concentraciones de HuL2G7, ChL2G7 o L2G7 purificados como competidor en conjunto con 50  $\mu$ l/pozo de HGF-bandera (1  $\mu$ g/ml). Después del lavado, las placas fueron incubadas entonces con 50  $\mu$ l/pozo de mAb anti-bandera HRP-M2 (Invitrogen) y el HRP-anti-bandera M2 unido fue detectado por la adición del substrato de tetrametilbencidina. La Figura 4 muestra que el HuL2G7, el ChL2G7 y el L2G7 compitieron esencialmente bien de manera equitativa con el L2G7 unido a la placa en el enlace del HGF-bandera soluble, indicando que estos tres mAbs tienen una afinidad muy similar.

Una actividad biológica clave del HGF es la habilidad de enlazarse a su receptor c-Met, de modo que se comparó la habilidad de los mAbs HuL2G7, ChL2G7 y L2G7 de inhibir el enlace del HGF con el Met. Se usó el Met en la forma de Met-Fc y HGF en la forma de HGF-bandera, que fueron preparados como se describe (solicitud de Patente USSN 10/917,915, presentada el 13 de Agosto del 2004, y Kim et al. Clin Cancer Res 12:1292, 2006). Se cubrió una placa microtiter con 50  $\mu$ l/pozo de 2  $\mu$ g/ml cada uno de los dos mAbs anti-Met (Galaxy

Biotech) en PBS durante la noche a 4 °C (de manera alternativa, 2 µg/ml de GohlgG-Fc pueden ser usados) y se bloqueó con 2% de BSA durante 1 hora a RT. Después del lavado de las placas, 50 µl/pozo de Met-Fc (1 µg/ml) se añadieron a cada pozo durante 1 hora a RT, seguido después del lavado de 50 µl/pozo de IgG humano (10 µg/ml) durante 1 hora para reducir el fondo. Después de lavar los placas, se añadieron 50 µl/pozo de HGF-bandera (0.5 µg/ml) pre-incubado con varias concentraciones de mAbs para cada pozo durante 1 hora. Después del lavado, las placas fueron incubadas con 50 µl/pozo de mAb anti-bandera HRP-M2 (Invitrogen), y la HRP-anti-bandera-M2 unida fue detectada por la adición del sustrato como se describe anteriormente. La Figura 5 muestra este enlace bloqueada igualmente bien del HuL2G7, del ChL2G7 y del L2G7, del HGF, con el Met, de modo que estos mAbs tienen una actividad muy similar en esta prueba.

Otra actividad biológica importante del HGF es la habilidad de estimular la proliferación de ciertas células, incluyendo las células epiteliales de pulmón de visón Mv 1 Lu. Para comparar la habilidad del HuL2G7 y del L2G7 para neutralizar esta actividad del HGF, las células Mv 1 Lu ( $2 \times 10^4$  células/100 µL/pozo) desarrolladas en DMEM, conteniendo 10% de FCS, fueron re-suspendidas en DMEM sin suero y estimuladas con 100 µL/pozo de HGF (40 ng/mL) más el crecimiento transformador del factor-β1 (1 ng/mL, R&D Systems), para reducir el antecedente, y varias concentraciones de HuL2G7, de L2G7 o de anticuerpo humano irrelevante de control. El nivel de proliferación celular fue determinado por medio de la adición de WST-1 (Roche Applied Science) durante 14 horas. La Figura 6 muestra que el HuL2G7 y el L2G7 tuvieron una actividad igualmente inhibidora en

esta prueba. En resumen, el HuL2G7 fue por lo menos igualmente activo que el L2G7 en todas las pruebas realizadas, y es por lo tanto totalmente neutralizador; ninguna actividad del L2G7 fue perdida en el proceso de humanización.

### 3. Habilidad del HuL2G7 para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*

Ya se ha mostrado que el mAb L2G7 es capaz de inhibir completamente el crecimiento de los xenoinjertos de glioma U87 en los modelos de ratón desnudo (solicitud de Patente USSN 10/917,915, presentada el 13 de Agosto del 2004, y Kim et al. Clin Cancer Res 12:1292, 2006). Para verificar que el HuL2G7 también tiene esta habilidad, se uso el mismo procedimiento experimental. Brevemente, ratones hembra NIH III Xid/Beige/Desnudos de 4-6 semanas de edad (Charles River Laboratories) fueron inyectados s.c. con 10<sup>7</sup> células en 0.1 ml de PBS en las áreas dorsales. Cuando el tamaño del tumor alcanzó ~50 mm<sup>3</sup>, los ratones fueron divididos aleatoriamente en grupos (n = 6 por grupo) e inyectados con 40 µg de HuL2G7, de L2G7 o de PBS de control i.p. dos veces por semana en un volumen de 0.1 ml de PBS. Los volúmenes de tumor fueron determinados semanalmente al medir dos dimensiones (longitud, a, y ancho, b) y se calculo el volumen como  $V = ab^2/2$ . La Figura 7 muestra que el HuL2G7 y el L2G7 inhibieron el crecimiento del tumor de manera indistinguible en esta prueba. Para definir adicionalmente la habilidad del HuL2G7 para inhibir el crecimiento del xenoinjerto de tumor, se usaron cuatro diferentes dosis del mAb, 40 µg, 20 µg, 10 µg y 5 µg, en un experimento similar. La Figura 8 muestra que aún la dosis marcadamente baja de 10 µg dos veces por semana

fueron capaz de inhibir completamente el crecimiento del tumor, mientras la dosis aún menor de 5  $\mu$ g produjo una inhibición buena, pero incompleta. De manera similar, cuando se administro sistemáticamente, el HuL2G7 inhibió efectivamente el crecimiento de xenoinjertos U87 intracraneales.

Aunque la invención ha sido descrita con relación a las modalidades preferidas actualmente, debe entenderse que varias modificaciones pueden hacerse sin alejarse de la invención.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas se incorporan aquí a manera de referencia en su totalidad para todos los propósitos, con la misma extensión como si cada publicación, patente o solicitud de patente individual fuese específica e individualmente indicada para ser incorporada a manera de referencia en su totalidad para todos los propósitos.

El hibridoma L2G7 ha sido depositado el 29 de Abril del 2003 con la American Type Culture Collection, P.O. Box 1549 Manassas, VA 20108, con el Número ATCC PTA-5162, bajo el Tratado de Budapest. Este depósito será mantenido en un depósito autorizado y reemplazado en la ocurrencia de una mutación, la no viabilidad o una destrucción, durante un periodo de por lo menos cinco años después de que la solicitud más reciente de liberación de una muestra fuese recibida por el depósito, durante un periodo de por lo menos treinta años después de la fecha del depósito, o durante el cumplimiento de la vida de la patente relacionada, cualquier periodo que sea el más largo. Todas las restricciones sobre la disponibilidad pública de estas líneas celulares serán removidas de manera irrevocable por la emisión de una patente

de la solicitud.

### Reivindicaciones

1. Un anticuerpo monoclonal humanizado (mAb) caracterizado porque enlaza y neutraliza el Factor de Crecimiento del Hepatocito (HGF) humano.
- 5 2. El mAb de la reivindicación 1, caracterizado porque es un mAb L2G7 humanizado.
3. El mAb de la reivindicación 2, caracterizado porque inhibe el enlace del HGF con el Met en por lo menos un 50%.
4. El mAb de la reivindicación 2, caracterizado porque  
10 inhibe la proliferación inducida por HGF en las células Mv 1 Lu.
5. El mAb de la reivindicación 2, caracterizado porque neutraliza todas las actividades biológicas del HGF.
6. El mAb de la reivindicación 2, caracterizado porque  
15 inhibe el crecimiento de un xenoinjerto de tumor humano en un ratón.
7. El mAb de la reivindicación 6, caracterizado porque inhibe completamente el crecimiento de un xenoinjerto de tumor humano en un ratón.
- 20 8. Un mAb humanizado caracterizado porque su región variable de cadena pesada tiene la secuencia de la Figura 2A etiquetada como HuL2G7.
9. Un mAb humanizado caracterizado porque incluye una región variable madura de cadena pesada que tiene la  
25 secuencia de aminoácido de la Figura 2A etiquetada como HuL2G7, excepto que el primer aminoácido es reemplazado con Gln.
10. Un mAb humanizado de la reivindicación 8, caracterizado porque incluye adicionalmente una región  
30 variable de cadena ligera madura que tiene la secuencia de aminoácido de la Figura 2B etiquetada como HuL2G7.

11. Un mAb humanizado caracterizado porque incluye regiones variables maduras de cadena pesada y ligera que tienen secuencias de aminoácidos que son idénticas por lo menos en un 90% a aquellas de las Figura 2A etiquetadas como  
5 HuL2G7 y de la Figura 2B etiquetada como HuL2G7, respectivamente.

12. Un mAb humanizado de la reivindicación 11, caracterizado porque sus secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera son idénticas por lo menos en un 95% a  
10 aquellas del mAb de la reivindicación 10.

13. Un mAb humanizado de las reivindicaciones 11 ó 12, provisto que por lo menos una posición seleccionada del grupo que consiste de H29, H30, H48, H66, H67, H71, H94, L3 y L60 es ocupada por el aminoácido presente en la posición  
15 correspondiente en la numeración de Kabat en el L2G7 de ratón.

14. El mAb humanizado de las reivindicaciones 11 ó 12, provisto que por lo menos tres posiciones seleccionadas de dicho grupo son ocupadas por el aminoácido presente en la  
20 posición correspondiente mediante la numeración de Kabat en el anticuerpo L2G7 de ratón.

15. El mAb humanizado de las reivindicaciones 11 ó 12, provisto que todas las posiciones de dicho grupo son ocupadas por el aminoácido presente en la posición correspondiente  
25 mediante la numeración de Kabat en el anticuerpo L2G7 de ratón.

16. El mAb humanizado de la reivindicación 15, provisto además que la posición H1 es ocupada por Glu.

17. Un mAb humanizado de la reivindicación 10,  
30 caracterizado porque es del isotipo (IgG1, K).

18. Un mAb humanizado de la reivindicación 2,

caracterizado porque neutraliza las actividades biológicas del HGF, así como lo hace también el L2G7.

19. Un anticuerpo monoclonal humanizado (mAb) que enlaza y neutraliza el Factor de Crecimiento del Hepatocito (HGF), caracterizado porque el anticuerpo humanizado incluye cadenas pesada y ligera humanizadas, incluyendo la cadena pesada humanizada las CDRs del L2G7 y una marco abierto de lectura humano de la región variable de cadena pesada proporcionado de modo que por lo menos una posición del marco abierto de lectura humano de la región variable de cadena pesada, seleccionada del grupo que consiste de H29, H30, H48, H66, H67, H71, H94, es ocupada por el aminoácido que ocupa la posición correspondiente en la cadena pesada del L2G7; incluyendo la cadena ligera humanizada las CDRs del L2G7 y un marco abierto de lectura humano de la región variable de cadena ligera proporcionado de modo que por lo menos una posición seleccionada del grupo que consiste de L3 y L60 es ocupada por el aminoácido que ocupa la posición correspondiente en la cadena ligera del L2G7.

20. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 19, caracterizado porque todos los aminoácidos del grupo que consiste de H29, H30, H48, H66, H67, H71 y H94, son ocupados por el aminoácido que ocupa la posición correspondiente en la cadena pesada del L2G7 y cada posición seleccionada del grupo que consiste de L3 y L60 es ocupada por el aminoácido que ocupa la posición correspondiente en la cadena ligera del L2G7.

21. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 19, provisto además que la posición H1 está ocupada por Glu:

22. Una línea celular caracterizada porque produce un mAb de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

23. Una composición farmacéutica caracterizada porque incluye un mAb de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

24. Un método para tratar el cáncer en un paciente  
5 caracterizado porque incluye la administración al paciente de una composición farmacéutica que incluye un mAb de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

25. Un método de la reivindicación 24, caracterizado porque dicho cáncer es un glioblastoma.

10 26. El uso de un mAb de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para la fabricación de un medicamento.

27. El uso de la reivindicación 26, para el tratamiento del cáncer.

15 28. El uso de la reivindicación 26, en donde el cáncer es un glioblastoma.

A

|           |            |            |                   |
|-----------|------------|------------|-------------------|
|           | 1          | 2          | 3                 |
| 123456789 | 0123456789 | 0123456789 | 0123456789        |
| QVQLQQSGA | DLMKPGASVK | ISCKATGYTF | <u>SGNWIEWVKQ</u> |

|            |                    |            |            |
|------------|--------------------|------------|------------|
| 4          | 5 a                | 6          | 7          |
| 0123456789 | 01223456789        | 0123456789 | 0123456789 |
| RPGHGLEWIG | <u>EILPGSGNTNY</u> | NEKFKGKATF | TADTSSNTAY |

|               |            |                  |          |
|---------------|------------|------------------|----------|
| 8 abc         | 9          | 10abc            | 11       |
| 0122223456789 | 0123456789 | 0000123456789    | 0123     |
| MQLSSLTSEDSAV | YYCARGGHYY | <u>GSSWDYWGQ</u> | TTL TVSS |

B

|           |            |            |                   |
|-----------|------------|------------|-------------------|
|           | 1          | 2          | 3                 |
| 123456789 | 0123456789 | 0123456789 | 0123456789        |
| NIVMTQSPK | SMSMSVGERV | TLTCKASENV | <u>VTYVSWYQQK</u> |

|            |                   |            |            |
|------------|-------------------|------------|------------|
| 4          | 5                 | 6          | 7          |
| 0123456789 | 0123456789        | 0123456789 | 0123456789 |
| PEQSPKLLIY | <u>GASNRYTGVP</u> | DRFTGSGSAT | DFTLTISVQ  |

|            |                   |           |
|------------|-------------------|-----------|
| 8          | 9                 | 10        |
| 0123456789 | 0123456789        | 012345678 |
| AEDLADYHCG | <u>QGYSYPYTFG</u> | GGTKLEIKR |

FIGURA 1

2/8

## A

|          | 1                | 2          | 3          |
|----------|------------------|------------|------------|
|          | 123456789        | 0123456789 | 0123456789 |
| L2G7     | QVQLQQSGA        | DLMKPGASVK | ISCKATGYTF |
| HuL2G7   | <u>EVQLVQSGA</u> | EVKKPGASVK | VSCKVSGYTF |
| AAC18323 | QVQLVQSGA        | EVKKPGASVK | VSCKVSGYTL |

|          | 4          | 5 a                | 6          | 7          |
|----------|------------|--------------------|------------|------------|
|          | 0123456789 | 01223456789        | 0123456789 | 0123456789 |
| L2G7     | RPGHGLEWIG | <u>EILPGSGNTNY</u> | NEKFKGKATF | TADTSSNTAY |
| HuL2G7   | APGKGLEWIG | <u>EILPGSGNTNY</u> | NEKFKGKATM | TADTSTDYAY |
| AAC18323 | APGKGLEWMG | gfdpedgetiy        | aqkfqqRVTM | TEDTSTDYAY |

|          | 8 abc         | 9          | 10abc                 | 11   |
|----------|---------------|------------|-----------------------|------|
|          | 0122223456789 | 0123456789 | 0000123456789         | 0123 |
| L2G7     | MQLSSLTSEDSAV | YYCARGGHYY | <u>GSSWDYWGQGTTL</u>  | TVSS |
| HuL2G7   | MELSSLRSEDYAV | YYCARGGHYY | <u>GSSWDYWGQGTTLV</u> | TVSS |
| AAC18323 | MELSSLRSEDYAV | YYCATpvgrc | sst*dyWGQGTTLV        | TVSS |

\* insertion of scyhpl between sst and dyW

## B

|          | 1                | 2          | 3          |
|----------|------------------|------------|------------|
|          | 123456789        | 0123456789 | 0123456789 |
| L2G7     | NIVMTQSPK        | SMSMSGERV  | TLTCKASENV |
| HuL2G7   | <u>DIVMTQSPS</u> | SLSASVGDRV | TITCKASENV |
| BAC01726 | DIQMTQSPS        | SLSASVGDRV | TITCrasqsi |

|          | 4          | 5                 | 6                 | 7          |
|----------|------------|-------------------|-------------------|------------|
|          | 0123456789 | 0123456789        | 0123456789        | 0123456789 |
| L2G7     | PEQSPKLLIY | <u>GASNRYTGVP</u> | DRFTGSGSAT        | DFTLTISVQ  |
| HuL2G7   | PGKAPKLLIY | <u>GASNRYTGVP</u> | <u>DRFSGSGSGT</u> | DFTLTISLQ  |
| BAC01726 | PGKAPKLLIY | AasslqsGVP        | SRFSGSGSGT        | DFTLTISLQ  |

|          | 8          | 9                 | 10        |
|----------|------------|-------------------|-----------|
|          | 0123456789 | 0123456789        | 012345678 |
| L2G7     | AEDLADYHCG | <u>QGYSYPYTFG</u> | GGTKLEIKR |
| HuL2G7   | PEDFATYYCG | <u>QGYSYPYTFG</u> | QGTKLEIKR |
| BAC01726 | PEDFATYYCq | qsystpytFG        | QGTKLEIKR |

FIGURA 2

## A

1  
-19 M D C T W R I L F L V A A A T G T H A E V Q L V Q S G A E V  
12 K K P G A S V K V S C K V S G Y T F S G N W I E W V R Q A P  
42 G K G L E W I G E I L P G S G N T N Y N E K F K G K A T M T  
72 A D T S T D T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G G H  
102 Y Y G S S W D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L  
132 A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W  
162 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V  
192 P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K  
222 S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K  
252 D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y  
282 V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V  
312 L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K  
342 A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L  
372 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L  
402 D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M  
432 H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

## B

1  
-20 M E A P A Q L L F L L L L W L P D T H G D I V M T Q S P S S  
11 L S A S V G D R V T I T C K A S E N V V T Y V S W Y Q Q K P  
41 G K A P K L L I Y G A S N R Y T G V P D R F S G S G S G T D  
71 F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C G Q G Y S Y P Y T F G Q  
101 G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A  
131 S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q  
161 E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K  
191 V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

FIGURA 3

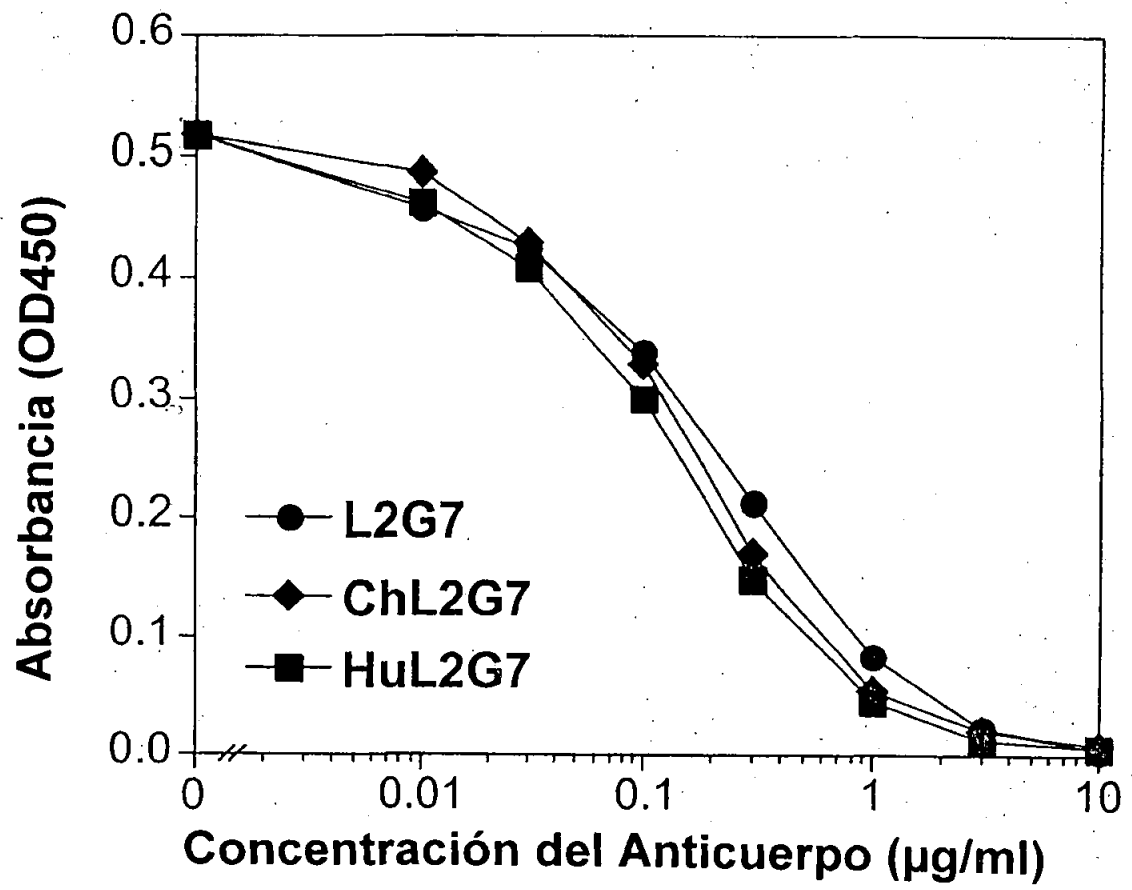


FIGURA 4

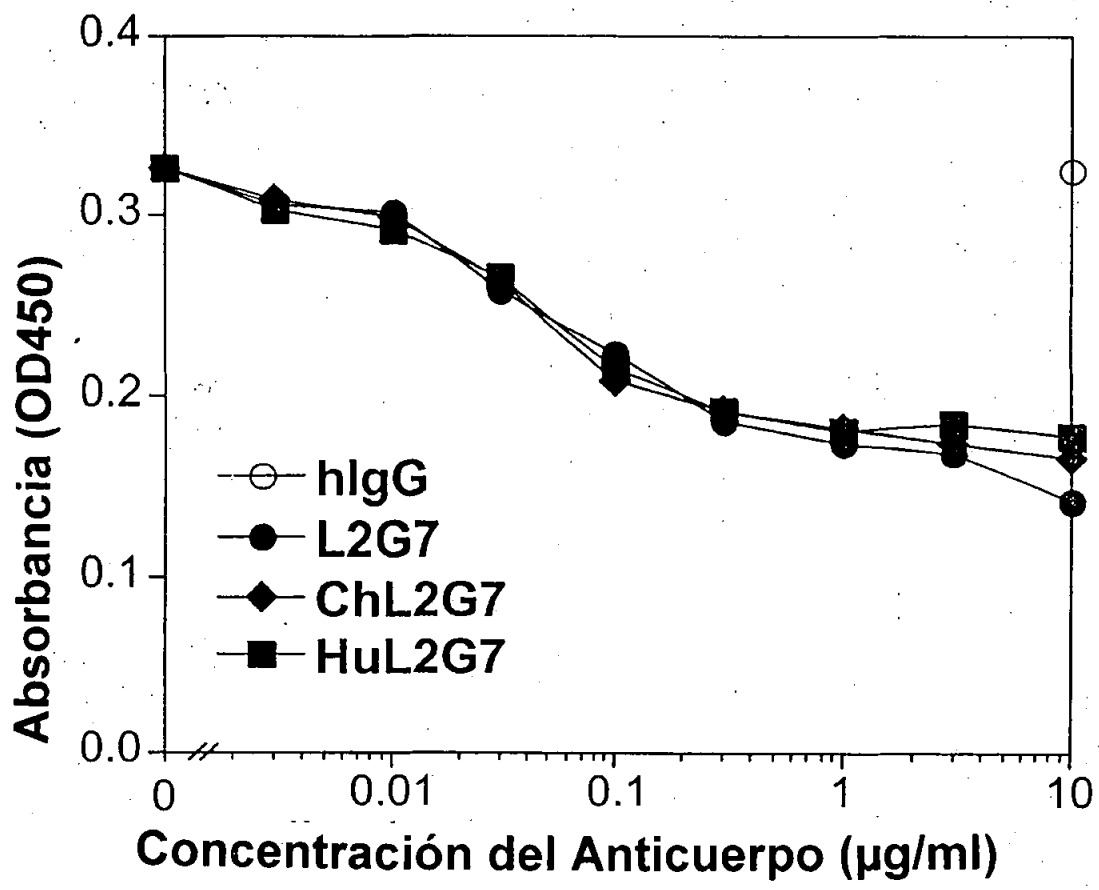


FIGURA 5

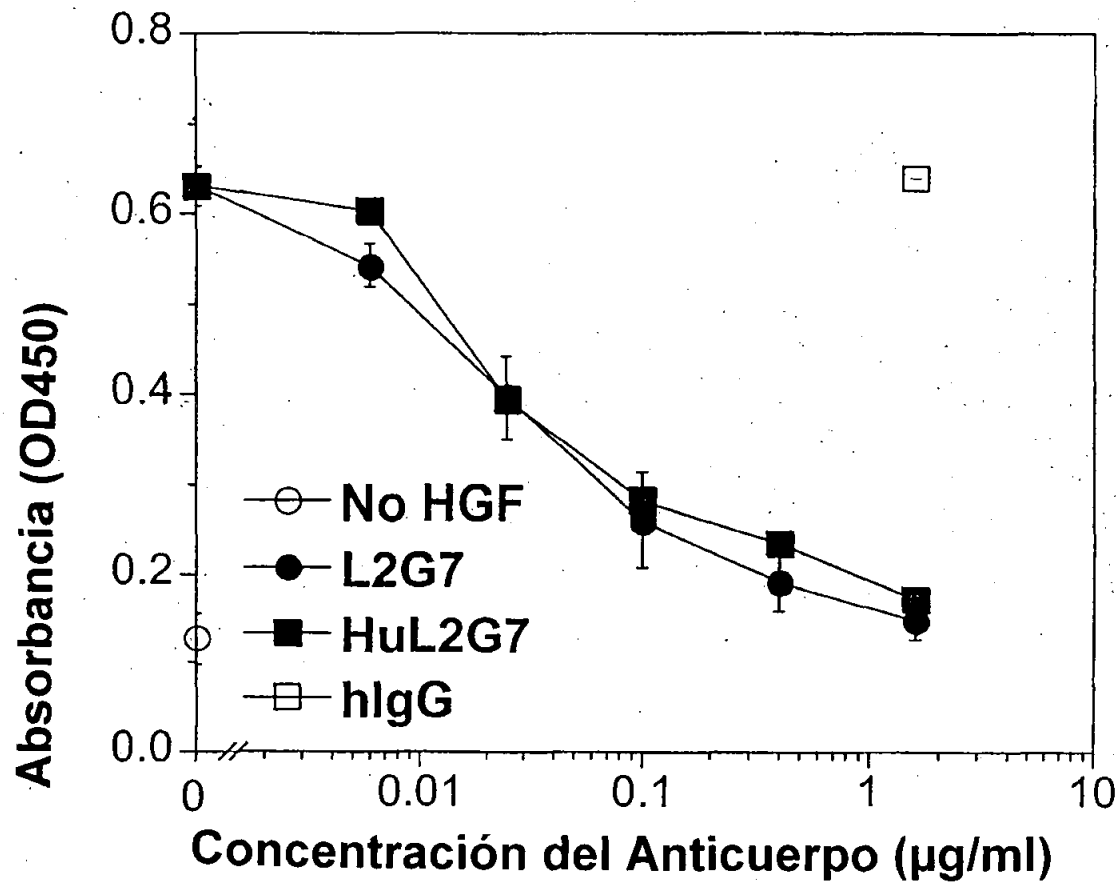


FIGURA 6

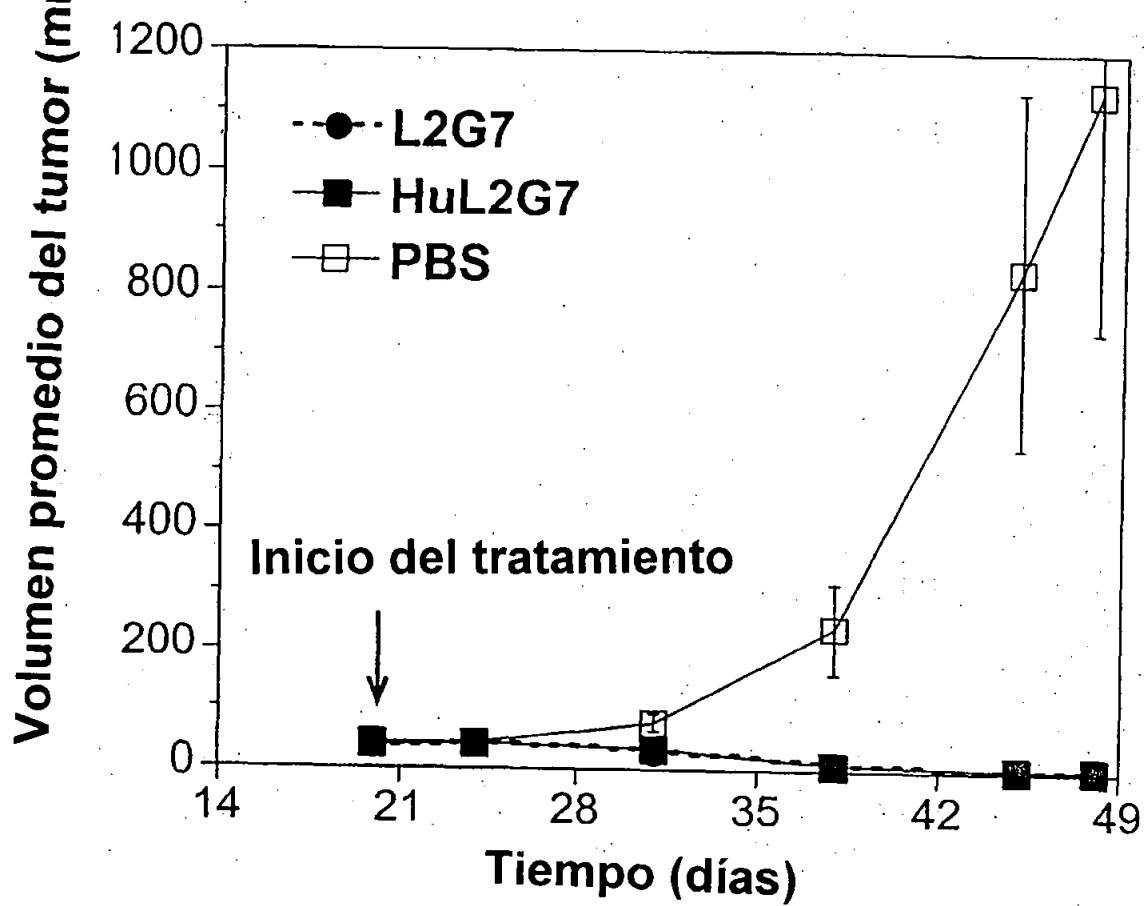


FIGURA 7

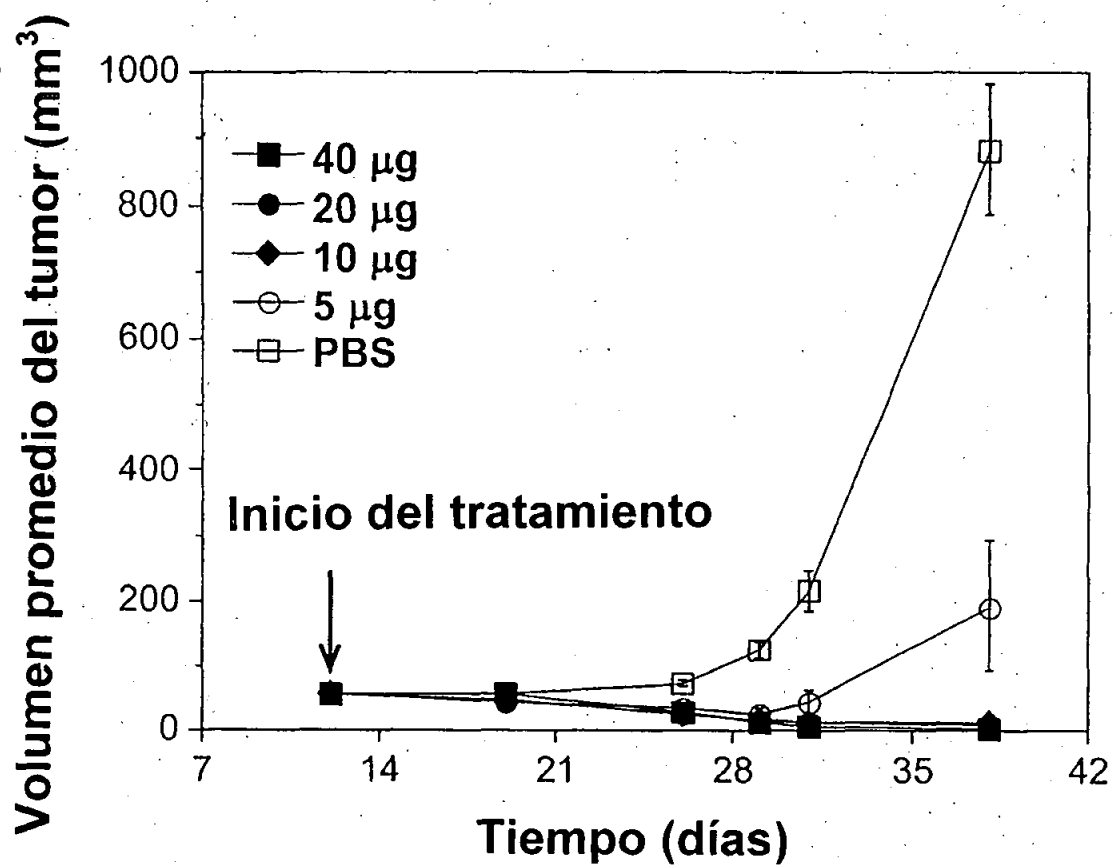


FIGURA 8

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
11 October 2007 (11.10.2007)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2007/115049 A2**

(51) International Patent Classification:  
C11D 3/00 (2006.01)

(21) International Application Number:  
PCT/US2007/065385

(22) International Filing Date: 28 March 2007 (28.03.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/788,243 1 April 2006 (01.04.2006) US

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KIM, Kyung, Jin [US/US]; 22830 San Juan Road, Cupertino, California 95014 (US). WANG, Lihong [CN/US]; 275 Ventura Ave #24, Palo Alto, California 94306 (US). PARK, Hangil [KR/US]; 18 Mounds Rd #3, San Mateo, California 94402 (US). VASQUEZ, Maximiliano [US/US]; 3813 Louis Road, Palo Alto, California 94303 (US).

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

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, 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.

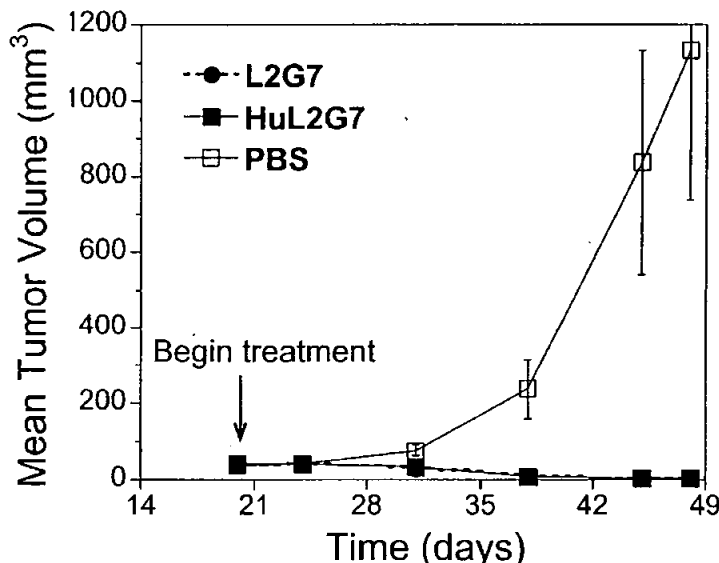
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, 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

[Continued on next page]

(54) Title: HUMANIZED MONOCLONAL ANTIBODIES TO HEPATOCYTE GROWTH FACTOR



(57) Abstract: The present invention is directed toward a humanized neutralizing monoclonal antibody to hepatocyte growth factor, a pharmaceutical composition comprising same, and methods of treatment comprising administering such a pharmaceutical composition to a patient.

WO 2007/115049 A2

# PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:  
JOE LIEBESCHUETZ  
TWO EMBARCADERO CENTER, 8TH FLOOR  
SAN FRANCISCO, CA 94111-3834

022382-000400PC

JOL

## PCT

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

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing  
(day/month/year)

08 JUL 2008

Applicant's or agent's file reference  
22382-4PC

**FOR FURTHER ACTION** See paragraphs 1 and 4 below

International application No.  
PCT/US07/65385 ✓

International filing date  
(day/month/year) 28 March 2007 (28.03.2007) ✓

Applicant  
GALAXY BIOTECH, LLC

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

**Filing of amendments and statement under Article 19:**

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

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

9/8/08

**Where?** Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70.

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

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

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

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

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

4. **Reminders**

10/1/07

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

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

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

12/1/07

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

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

Name and mailing address of the ISA/US

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

Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

Sharon Wen

Telephone No. (571) 272-1600

*Janice Ford*

Form PCT/ISA/220 (January 2004)

(See notes on accompanying sheet)

art 19  
filed  
Search report  
checked By T35

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                    |                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                  |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>22382-4PC | <b>FOR FURTHER ACTION</b> <div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: small;"> <span></span> <span>see Form PCT/ISA/220<br/>as well as, where applicable, item 5 below.</span> </div> |                                                                                  |
| International application No.<br>PCT/US07/65385    | International filing date ( <i>day/month/year</i> )<br>28 March 2007 (28.03.2007)                                                                                                                               | (Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> )<br>01 April 2006 (01.04.2006) |
| Applicant<br>GALAXY BIOTECH, LLC                   |                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                  |

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

This international search report consists of a total of 3 sheets.

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

**1. Basis of the Report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
- ☐ a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 Rule 43.6 *bis(a)*

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

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

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

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

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

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_

- ☐ as suggested by the applicant.
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

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

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/65385

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 26-28  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
claims are drawn to "use" claims
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such  
an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 16  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all  
searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment  
of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report  
covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is  
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the  
payment of a protest fee.
  - ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee  
was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/65385

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: C11D 3/00( 2006.01)

USPC: 424/133.1

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/133.1; 530/387.1

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
DIALOG, EAST

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X          | US 2005/0019327 A1(Kim et al) 27 January 2005 (27.01.2005), see entire document    | 1-15, 17-25           |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search

04 June 2008 (04.06.2008)

Date of mailing of the international search report

08 JUL 2008

Name and mailing address of the ISA/US

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

Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

Sharon Wen

Telephone No. (571) 272-1600

*Janice Ford for*

# PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:  
JOE LIEBESCHUETZ  
TWO EMBARCADERO CENTER, 8TH FLOOR  
SAN FRANCISCO, CA 94111-3834

*JOL*

**PCT**

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

*022382-000400 PC*

Date of mailing  
(day/month/year) **08 JUL 2008**

Applicant's or agent's file reference  
22382-4PC

**FOR FURTHER ACTION**  
See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US07/65385 /

International filing date (day/month/year)

28 March 2007 (28.03.2007) ✓

Priority date (day/month/year)

01 April 2006 (01.04.2006) ✓

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

IPC: **C11D 3/00** (2006.01)

USPC: 530/387.1

Applicant

GALAXY BIOTECH, LLC

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

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

## 2. FURTHER ACTION

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

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

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

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

Name and mailing address of the ISA/ US  
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US  
Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450  
Facsimile No. (571) 273-3201

Date of completion of this opinion  
04 June 2008 (04.06.2008)

Authorized officer

Sharon Wen

Telephone No. (571) 272-1600

*Janice Ford*

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (April 2007)

*RESP to unit CPN  
checked By TBS*

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US07/65385

Box No. 1 Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed  
☐ a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

2. ☐ 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 43bis.1(a))

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

a. type of material

- ☐ a sequence listing  
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☐ on paper  
☐ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☐ contained in the international application as filed.  
☐ filed together with the international application in electronic form.  
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

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

5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US07/65385

**Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application  
☒ claims Nos. 16 and 26-28

because:

- ☒ the said international application, or the said claim Nos. 26-28 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

claims 26-28 are drawn to "use" claims.

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 16 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

claim 16 is an improper multiple dependent claim

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter.* I(a) or (b).

- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

- ☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.  
PCT/US07/65385

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

1. Statement

|                               |                              |     |
|-------------------------------|------------------------------|-----|
| Novelty (N)                   | Claims <u>NONE</u>           | YES |
|                               | Claims <u>1-15 and 17-25</u> | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims <u>NONE</u>           | YES |
|                               | Claims <u>1-15 and 17-25</u> | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims <u>1-15 and 17-25</u> | YES |
|                               | Claims <u>NONE</u>           | NO  |

2. Citations and explanations:

Claims 1-15 and 17-25 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by Kim et al. (US 2005/0019327 A1, see entire document). The prior art teaches the humanized L2G7 monoclonal antibody, a cell line producing the antibody and the pharmaceutical composition comprising the antibody (see, e.g., page 3 and 5 and claims 1 and 3). Given the prior art teaches the same or nearly the same antibody, humanized L2G7 mAb, it would inherently meet the characterization of the antibody recited in claims 3-7 the present application because products of identical chemical composition can not have mutually exclusive properties.

Claims 1-15 and 17-25 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4).

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

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

|                                                                      |                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>25 June 2007 (25.06.2007)        |                                                                          |
| Applicant's or agent's file reference<br>22382-4PC                   | IMPORTANT NOTIFICATION                                                   |
| International application No.<br>PCT/US2007/065385                   | International filing date (day/month/year)<br>28 March 2007 (28.03.2007) |
| International publication date (day/month/year)<br>Not yet published | Priority date (day/month/year)<br>01 April 2006 (01.04.2006)             |
| Applicant<br>GALAXY BIOTECH, LLC et al                               |                                                                          |

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

| Priority date              | Priority application No. | Country or regional Office<br>or PCT receiving Office | Date of receipt<br>of priority document |
|----------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 01 April 2006 (01.04.2006) | 60788243                 | US                                                    | 15 June 2007 (15.06.2007)               |

|                                                                                               |                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br><br>Beate Giffo-Schmitt |
| Facsimile No. +41 22 338 82 70                                                                | Facsimile No. +41 22 338 82 70                |
|                                                                                               | Telephone No. +41 22 338 74 03                |

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-115094-00000-0000

Fecha: 2008-10-28 15:21:37 Dep. 2020 NUECREACION  
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONAL I  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73



**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

**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

28 OCT / 08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10  
Conmutador: 3 82 08 40  
Fax: 350 52 20  
E-mail: [info@slc.gov.co](mailto:info@slc.gov.co)  
[www.slc.gov.co](http://www.slc.gov.co)  
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,  
2020

Doctor(a)  
RODRIGUEZ D<sup>a</sup> ALEMAN DILIA MARIA  
Apoderado(a) y/o Representante de  
GALAXY BIOTECH, LLC

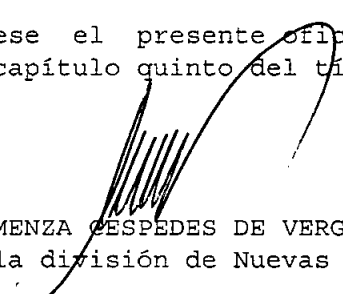
|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 8 115094          |
|            | Solicitud internacional    | PCT/US2007/065385 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 01/11/2008        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | <b>Nº 14504</b>   |

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.

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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 14 NOV. 2008.  
jfernand