

PCT

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA A LA FASE NACIONAL

10-61143

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO

COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO DE LA QUINASA-1 SIMILAR
AL RECEPTOR DE LA ACTIVINA

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

GENENTECH, INC.

DOMICILIO

SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. BOGOTÁ, D.C.

09-06-2010

AS: 113.747

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-061143-00000-0000

Fecha: 2010-05-21 16:44:51
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 205FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE

Nombre: GENENTECH, INC.

Dirección: 1 DNA Way South San Francisco,
CA 94080, US.Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de
América.Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América.

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Calle 70A #4 – 41, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

80.410.337 TP 57492

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura
de Propiedad Industrial, sírvase indicar el numero de radicación (del poder).

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Minhong YAN, Gu ZHANG.

Dirección: 411 Nantucket Street Foster City, California 94404, US; 243 Anita Drive
Millbrae, California 94030, US (respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/US2008/082465

Fecha

05.11.2008

Publicación Internacional No

WO 2009/061807 A3

Fecha

14.05.2009

6 Título (54): COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO DE LA QUINASA-1 SIMILAR AL
RECEPTOR DE LA ACTIVINA

7 Clasificación Internacional (51): A61K 38/17, A61P 35/00, A61K 39/395

8 Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

US

09.11.2007

60/986,876

US

19.09.2008

61/098,557

9 Comprobante de pago No. 10-26.149; 10-29.221; 10-26.220; 10-22.921; 10-3.233 Fecha 18-05-2010

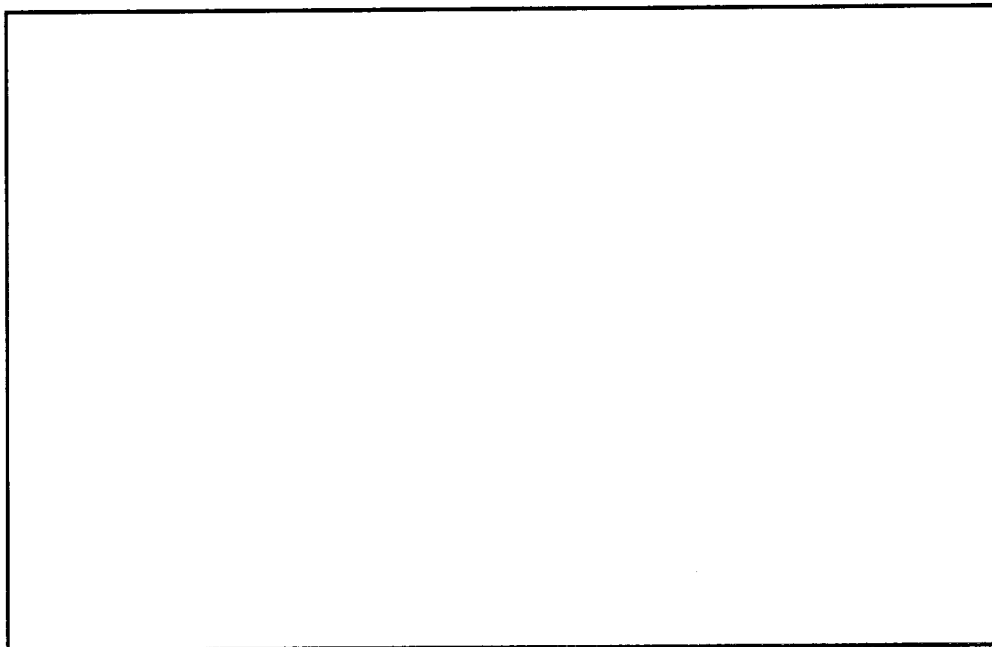
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 554.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada.**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. **Fotocopia autenticada.**
- ☒ 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 de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ 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: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales. \$ 468.000 (18*\$26.000)

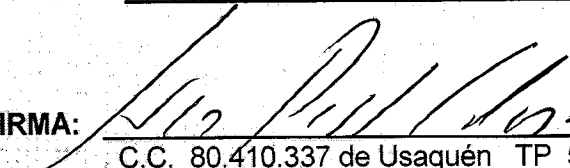
11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:


C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

113747

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 26,149
FECHA : ABRIL 7 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-061143- -00000-0000

Fecha: 2010-05-21 16:44:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 205

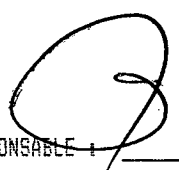
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80662256	07/04/2010	67,384,800.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
TOTAL :			\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

113747
4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 29,221

FECHA : ABRIL 15 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-061143- -00000-0000

Fecha: 2010-05-21 16:44:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 205

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80662271	15/04/2010	44,633,600.00

***** CONCEPTO *****

CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	260,000.00
99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	260,000.00
TOTAL :	\$ 260,000.00

SON: DOSCIENTOS SESENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

113747

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 26,220
FECHA : ABRIL 7 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-061143- -00000-0000

Fecha: 2010-05-21 16:44:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 205

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80662256	07/04/2010	67,384,800.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	130,000.00
		TOTAL :	\$ 130,000.00

SON: CIENTO TREINTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

113747

6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800174000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 22,921

FECHA : MARZO 24 DE 2010



No. 10-061143- -00000-0000

Fecha: 2010-05-21 16:44:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 205

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80662234	24/03/2010	33,751,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	52,000.00
		TOTAL :	\$ 52,000.00

SON: CINCUENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

113747

7

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 3,233
FECHA : ENERO 14 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-061143- -00000-0000

Fecha: 2010-05-21 16:44:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 205

Ri

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80662072	14/01/2010	59,839,800.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	SOLICITUDES	54 PROCC. REGISTRO DE MARCAS Y LENAS
			26,000.00
			TOTAL : \$ 26,000.00

SON: VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)
(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
14 May 2009 (14.05.2009)



(10) International Publication Number
WO 2009/061807 A3

(51) International Patent Classification:

A61K 38/17 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/71 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2008/082465

(22) International Filing Date:

5 November 2008 (05.11.2008)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/986,876 9 November 2007 (09.11.2007) US
61/098,557 19 September 2008 (19.09.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): YAN, Minhong [US/US]; 411 Nantucket Street, Foster City, California 94404 (US). ZHANG, Gu [US/US]; 243 Anita Drive, Millbrae, California 94030 (US).

(74) Agents: PAZDERA, Rosy Minako et al.; Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, ME, 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, ST, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the international search report:
24 September 2009

(54) Title: ACTIVIN RECEPTOR-LIKE KINASE-I ANTAGONIST COMPOSITIONS AND METHODS OF USE

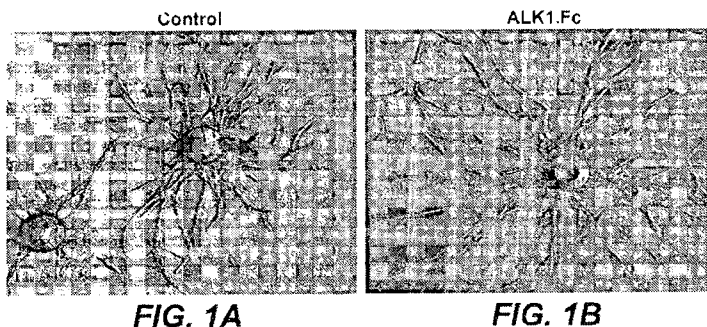


FIG. 1A

FIG. 1B

(57) Abstract: Disclosed herein are methods and compositions for treating disorders associated with angiogenesis or lymphangiogenesis using ALK-1 antagonists.

WO 2009/061807 A3

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
14 de Mayo de 2009 (14.05.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/061807 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 38/17 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/71 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(21) No. Solicitud Internacional:

PCT/US2008/082465

(22) Fecha de Presentación Internacional:

05 de Noviembre de 2008 (05.11.2008)

(25) Idioma de Presentación:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:

60/986,876 09 de Noviembre de 2007 (09.11.2007) EU
61/098,557 19 de Septiembre de 2008 (19.09.2008) EU

(71) Solicitante (para todos los países destinatarios con excepción de EU): **GENENTECH, INC.** [EU/EU]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (EU).

(72) Inventores, e

(75) Inventores/Solicitantes (para US únicamente): **YAN, Minhong** [EU/EU]; 411 Nantucket Street Foster City, California 94404 (EU). **ZHANG, Gu** [EU/EU]; 243 Anita Drive Millbrae, California 94030 (EU).

(74) Agente: **PAZDERA, Rosy Minako y otros**; 1 DNA Way MS 49 South San Francisco, CA 94080 (EU).

(81) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, 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) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- con el informe internacional de búsqueda (Art. 21 (3))
- antes de la fecha límite de expiración para modificar las reivindicaciones y a ser publicado nuevamente en el evento de recibir estas modificaciones (Regla 48.2 (h))
- con el listado de secuencias como parte de la descripción (Regla 5.2 (a))

Fecha de la publicación del Informe Internacional de Búsqueda:

24 de Septiembre de 2009

(54) Título: **COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO DE LA QUINASA-1 SIMILAR AL RECEPTOR DE LA ACTIVINA**

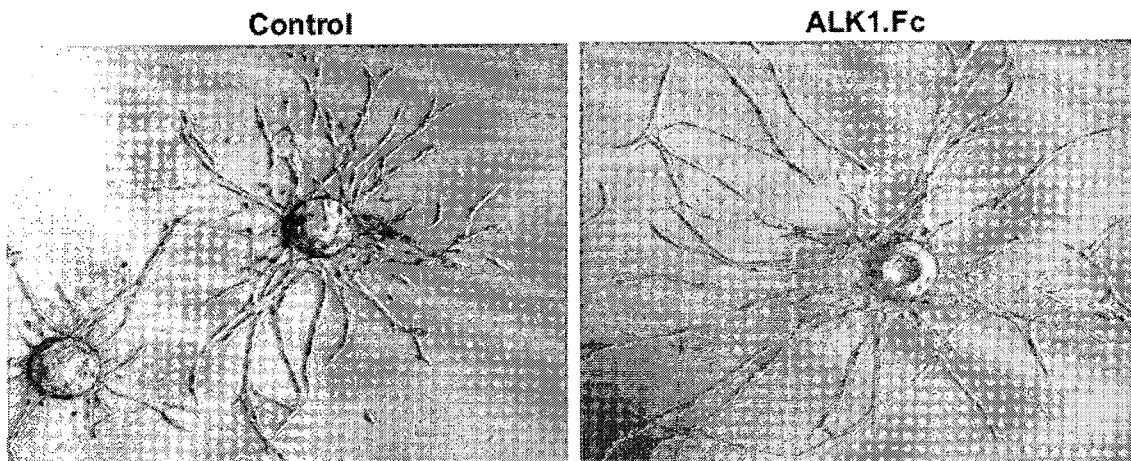


FIG. 1A

FIG. 1B

(57) Extracto: En la presente memoria descriptiva se revelan métodos y composiciones para el tratamiento de trastornos asociados con la angiogénesis o linfangiogénesis, que utilizan antagonistas de ALK-1.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 May 2009 (14.05.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/061807 A2

(51) International Patent Classification:

A61K 38/17 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/71 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2008/082465

(22) International Filing Date:

5 November 2008 (05.11.2008)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/986,876 9 November 2007 (09.11.2007) US
61/098,557 19 September 2008 (19.09.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): YAN, Minhong [US/US]; 411 Nantucket Street, Foster City, California 94404 (US).

(74) Agents: PAZDERA, Rosy Minako et al.; Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, ME, 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, ST, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(54) Title: ACTIVIN RECEPTOR-LIKE KINASE-1 COMPOSITIONS AND METHODS OF USE

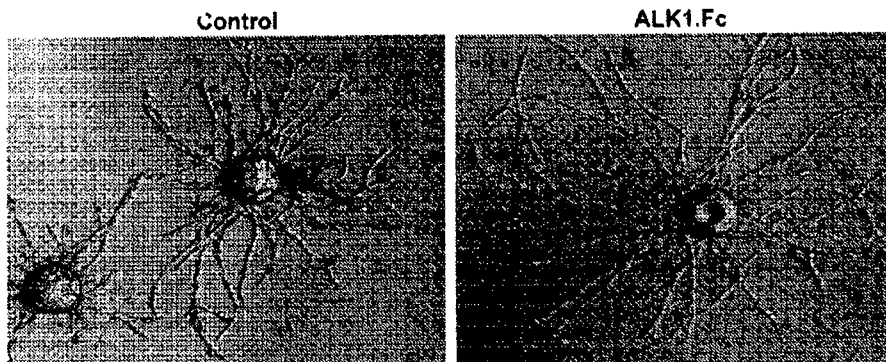


FIG. 1A

FIG. 1B

(57) Abstract: Disclosed herein are methods and compositions for treating disorders associated with angiogenesis or lymphangiogenesis using ALK-1 antagonists.

WO 2009/061807 A2

**COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO DE LA QUINASA-1 SIMILAR
AL RECEPTOR DE LA ACTIVINA**

[0001] SOLICITUD RELACIONADA

[0002] Esta solicitud reivindica prioridad sobre las solicitudes provisionales de EE.UU. con n.º de serie. 60/986.876 presentada el 9 de noviembre de 2007 y 61/098.557 presentada el 19 de septiembre de 2008, cuyo contenido completo se incorpora como referencia en la presente memoria descriptiva.

[0003] ÁMBITO DE LA INVENCION

[0004] La presente invención hace referencia a las composiciones y métodos relacionados con el uso de antagonistas de la quinasa-1 similar al receptor de la activina (ALK-1) para el tratamiento de los trastornos asociados con la angiogénesis o la linfangiogénesis.

[0005] ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0006] El desarrollo de un medio de aporte vascular es un requisito fundamental para muchos procesos fisiológicos y patológicos. Los tejidos que experimentan un crecimiento activo, como embriones y tumores, necesitan un adecuado aporte sanguíneo. Estos tejidos satisfacen esta necesidad mediante la producción de factores proangiogénicos, que fomentan la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante un proceso denominado angiogénesis. La formación de los conductos vasculares es un proceso biológico complejo pero perfectamente ordenado que comprende la totalidad o gran parte de los pasos siguientes: a) las células endoteliales (CE) proliferan a partir de las células endoteliales existentes o se diferencian a partir de las células progenitoras; b) las células endoteliales migran y se fusionan para formar estructuras en forma de cordón; c) los cordones vasculares experimentan entonces el proceso de tubulogénesis para formar vasos con un lumen central; d) de los cordones o vasos existentes empiezan a salir ramificaciones para formar vasos secundarios; e) el plexo vascular primitivo experimenta un nuevo remodelado y reorganización; y f) las células periendoteliales son atraídas para revestir a los tubos endoteliales, cumpliendo así funciones moduladoras y de sostén de los vasos. Estas células incluyen pericitos para capilares pequeños, células de músculo liso para vasos de mayor tamaño y miocardiocitos en el corazón. Hanahan, D. *Science* 277:48-50 (1997); Hogan, B.

L. & Kolodziej, P. A. *Nature Reviews Genetics*. 3:513-23 (2002); Lubarsky, B. & Krasnow, M. A. *Cell*. 112:19-28 (2003).

[0007] Se ha demostrado ampliamente que la angiogénesis interviene en la patogénesis de diversos trastornos. Estos incluyen tumores sólidos y metástasis, aterosclerosis, fibroplasia retrolental, hemangiomas, inflamación crónica, enfermedades neovasculares intraoculares como retinopatías proliferativas, por ejemplo, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), glaucoma neovascular, rechazo inmunitario de tejido corneal trasplantado y de otros tejidos, artritis reumatoide y psoriasis. Folkman y col., *J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934 (1992); Klagsbrun y col., *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-239 (1991); y Garner A., "Vascular diseases", En: *Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach*, Garner A., Klintworth GK, eds., 2ª Edición (Marcel Dekker, NY, 1994), páginas 1625-1710.

[0008] En el caso del crecimiento tumoral, la angiogénesis parece ser fundamental para la transición de la hiperplasia a la neoplasia y para proporcionar el sustento necesario para el crecimiento y la metástasis tumorales. Folkman y col., *Nature* 339:58 (1989). La neovascularización permite que las células tumorales adquieran una ventaja de crecimiento y una autonomía proliferativa frente a las células normales. Un tumor suele comenzar como una única célula anómala que puede proliferar sólo hasta alcanzar un tamaño de unos cuantos milímetros cúbicos debido a la distancia desde los lechos capilares disponibles y puede permanecer "inactiva" sin crecer ni diseminarse durante un período prolongado. Algunas células tumorales cambian posteriormente al fenotipo angiogénico para activar las células endoteliales, que proliferan y maduran hasta convertirse en vasos sanguíneos capilares nuevos. Estos vasos sanguíneos recién formados no sólo permiten el crecimiento continuo del tumor primario, sino también la diseminación y recolonización de células tumorales metastásicas. Por esta razón, se ha observado una correlación entre la densidad de los microvasos en cortes de tumores y la supervivencia de pacientes con cáncer de mama, así como también en otros tipos de tumores. Weidner y col., *N. Engl. J. Med* 324:1-6 (1991); Horak y col., *Lancet* 340:1120-1124 (1992); Macchiarini y col., *Lancet* 340:145-146 (1992). No se conocen bien los mecanismos exactos que controlan el cambio angiogénico, pero se cree que la neovascularización de la masa tumoral se produce como consecuencia del equilibrio neto de diversos estimuladores e inhibidores de la angiogénesis (Folkman, 1995, *Nat Med* 1(1):27-31 (1995)).

[0009] Actualmente se acepta que las metástasis son responsables de una gran mayoría, de aproximadamente 90 %, de las muertes por tumores sólidos (Gupta y Massague, *Cell* 127, 679-695 (2006)). El proceso complejo de la metástasis involucra una serie de pasos distintos que incluyen el desprendimiento de células tumorales del tumor

primario, la intravasación de las células tumorales en los vasos linfáticos o sanguíneos y la extravasación y crecimiento de las células tumorales en sitios secundarios. Los análisis realizados en nódulos linfáticos regionales en varios tipos de tumores sugieren que la vasculatura linfática es una ruta importante para la diseminación del cáncer en seres humanos. Además, en casi todos los carcinomas, la presencia de células tumorales en los nódulos linfáticos es el factor más importante para un pronóstico adverso. Mientras anteriormente se creía que las metástasis involucraban exclusivamente el paso de células malignas por vasos linfáticos preexistentes cerca de los tumores, existen estudios experimentales e informes clínico patológicos recientes (revisados en Achen et al., *Br J Cancer* 94 (2006), 1355-1360 y Nathanson, *Cancer* 98, 413-423 (2003)) que sugieren que los tumores sólidos pueden inducir la linfoangiogénesis y promover la diseminación del tumor. Éstos y otros estudios recientes sugieren que la terapia dirigida al sistema linfático y la linfoangiogénesis puede ser una estrategia terapéutica útil para restringir el desarrollo de la metástasis del cáncer, lo que tendría un beneficio significativo para muchos pacientes.

[0010] RESUMEN DE LA INVENCION

[0011] La presente invención se basa parcialmente en el descubrimiento de que los agentes que modulan la vía de ALK-1 son capaces de alterar tanto la angiogénesis, como la linfoangiogénesis. El tratamiento con un antagonista de ALK-1 dio como resultado un incremento en el brote de células endoteliales, desorganización de los pericitos y desarrollo vascular inapropiado incluyendo al tumor y la vasculatura linfática. Los modelos de tumores tratados con un antagonista de ALK-1 resultaron en inhibición del crecimiento de varios tipos de cáncer. Por ello, la invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos manufacturados para la alteración de la organización de los pericitos, la inhibición de la angiogénesis y/o la linfoangiogénesis para su uso en la terapia dirigida de las afecciones patológicas asociadas con la angiogénesis y linfoangiogénesis.

[0012] En un aspecto la invención proporciona un método de inhibición de la linfoangiogénesis que comprende la administración de una cantidad eficaz de un antagonista ALK-1 a un sujeto que requiera de la inhibición de la linfoangiogénesis, donde se inhibe la linfoangiogénesis. En algunas formas de realización el sujeto tiene, por ejemplo, un tumor, cáncer, un trastorno proliferativo, degeneración macular, una enfermedad mediada por la inflamación, artritis reumatoide, retinopatía diabética o psoriasis. En algunas formas de realización el tumor, el cáncer o el trastorno de proliferación celular es un carcinoma, linfoma, blastoma o leucemia.

[0013] En otro aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de afecciones patológicas asociadas con la linfoangiogénesis en un sujeto y comprende la

administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, donde se trata la afección patológica asociada con la linfoangiogénesis. En algunas formas de realización el sujeto tiene, por ejemplo, un tumor, cáncer, un trastorno proliferativo, degeneración macular, una enfermedad mediada por la inflamación, artritis reumatoide, retinopatía diabética o psoriasis. En algunas formas de realización el tumor, el cáncer o el trastorno de proliferación celular es un carcinoma, linfoma, blastoma o leucemia.

[0014] La invención también proporciona el uso de un antagonista de ALK-1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de un trastorno, tal como una afección patológica asociada con la angiogénesis o la linfoangiogénesis. Dichas afecciones incluyen, por ejemplo, cáncer, trastornos de proliferación celular, degeneración macular, enfermedad mediada por inflamación, artritis reumatoide, retinopatía o psoriasis. También se proporciona el uso de un antagonista de ALK-1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de la metástasis tumoral.

[0015] En otro aspecto la invención proporciona un método de inhibición de la linfoangiogénesis tumoral en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, donde se inhibe la linfoangiogénesis tumoral. Además se proporciona un método de inhibición o prevención de la metástasis del tumor en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, donde se inhibe o previene la metástasis del tumor. En algunas formas de realización el sujeto ha desarrollado o está en riesgo de desarrollar metástasis tumoral. La metástasis del tumor puede ser, por ejemplo, en el sistema linfático o en un órgano distante.

[0016] En otro aspecto la invención proporciona un método para alterar la organización de los pericitos en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, donde se altera la organización de los pericitos. En algunas formas de realización el sujeto tiene, por ejemplo, un tumor, cáncer, un trastorno proliferativo, degeneración macular, una enfermedad mediada por la inflamación, artritis reumatoide, retinopatía diabética o psoriasis. En algunas formas de realización el tumor, el cáncer o el trastorno de proliferación celular es un carcinoma, linfoma, blastoma o leucemia.

[0017] En otro aspecto, la invención proporciona un método de inhibición del crecimiento tumoral en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, donde se inhibe el crecimiento tumoral. La invención también proporciona un método de tratamiento del tumor, cáncer o trastorno de proliferación celular en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una

cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, donde se trata el tumor, cáncer o trastorno de proliferación celular. En algunas formas de realización el tumor, el cáncer o el trastorno de proliferación celular es, por ejemplo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma o leucemia.

[0018] En algunas formas de realización, los métodos de la invención comprenden además, la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un agente anti-angiogénesis. En algunas formas de realización el agente anti-angiogénesis es un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF. En algunas formas de realización el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab. En algunas formas de realización, los métodos de la invención comprenden además, la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos.

[0019] Un método para mejorar la eficacia de un agente antiangiogénico en un sujeto con un proceso patológico asociado con la angiogénesis, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1 en combinación con el agente antiangiogénico, lo que permite aumentar la actividad inhibidora de dicho agente antiangiogénico. En algunas formas de realización, el proceso patológico asociado con la angiogénesis es un tumor, un cáncer o un trastorno de proliferación celular.

[0020] En algunas formas de realización el antagonista de ALK-1 es una inmunoadhesina de ALK-1. En algunas formas de realización la inmunoadhesina de ALK-1 comprende los residuos de aminoácidos 22-352 del identificador de secuencia n.º: 2, residuos 22-349 del identificador de secuencia n.º: 4, residuos 22-347 del identificador de secuencia n.º: 6, residuos 22-350 del identificador de secuencia n.º: 8 o residuos 22-350 del identificador de secuencia n.º: 10. En otra forma de realización el antagonista ALK-1 es un anticuerpo anti-ALK-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

[0021] También se proporcionan los antagonistas de ALK-1 para su uso en la prevención, inhibición o tratamiento de la metástasis del tumor o para el tratamiento del tumor, del cáncer o del trastorno de proliferación celular. El antagonista ALK-1 puede ser, por ejemplo, una inmunoadhesina de ALK-1, un anticuerpo anti-ALK-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas formas de realización la inmunoadhesina de ALK-1 comprende los residuos de aminoácidos 22-352 del identificador de secuencia n.º: 2, residuos 22-349 del identificador de secuencia n.º: 4, residuos 22-347 del identificador de secuencia n.º: 6, residuos 22-350 del identificador de secuencia n.º: 8 o residuos 22-350 del identificador de secuencia n.º: 10. La invención también proporciona una composición para su uso en el tratamiento de un tumor, cáncer o trastorno de proliferación celular, que comprende una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización el antagonista de ALK-1 es una inmunoadhesina de ALK-1. En algunas formas de realización la inmunoadhesina de

ALK-1 comprende los residuos de aminoácidos 22-352 del identificador de secuencia n.º: 2, residuos 22-349 del identificador de secuencia n.º: 4, residuos 22-347 del identificador de secuencia n.º: 6, residuos 22-350 del identificador de secuencia n.º: 8 o residuos 22-350 del identificador de secuencia n.º: 10. En algunas formas de realización el antagonista de ALK-1 es un anticuerpo anti-ALK-1.

[0022] En un aspecto, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende un envase; y una composición contenida dentro del envase, donde la composición incluye un antagonista de ALK-1. En otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende un antagonista de ALK-1 y las instrucciones para su uso. También se proporciona un método de preparación de una composición, que incluye la mezcla de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de ALK-1 con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0023] **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

[0024] Las Figuras 1A-1B muestran imágenes de microscopio de contraste de fases obtenidas el día 9 de los ensayos de brote de cultivos celulares HUVEC en geles de fibrina 3-D en ausencia (Figura 1A) o en presencia (Figura 1B) de ALK1.Fc (5µg/ml).

[0025] Las Figuras 2A-2F muestran imágenes confocales de retinas de rata obtenidas en P11 y teñidas con anti-CD31 y Lectina-FITC. A ratas recién nacidas se les inyectó 10 mg/kg ALK1.Fc o PBS por vía intraperitoneal el día postnatal 4 (P4), P6 y P9.

[0026] Las Figuras 3A-3F muestran imágenes confocales de las retinas de rata extraídas en P11 y teñidas con el conjugado de anti-alfa actina del músculo (ASMA) y Cy3 y Lectina-FITC. A ratas recién nacidas se les inyectó 10 mg/kg ALK1.Fc o PBS por vía intraperitoneal el día P4, P6 y P9.

[0027] Las Figuras 4A-4F muestran imágenes confocales de las retinas de rata extraídas en P11 y teñidas con el conjugado de anti-alfa actina del músculo (ASMA) y Cy3 y Lectina-FITC. A ratas recién nacidas se les inyectó 10 mg/kg ALK1.Fc o PBS por vía intraperitoneal el día P4, P6 y P9.

[0028] Las Figuras 5A-5B son gráficas que muestran que ALK1.Fc (10 mg/kg) inhibe el crecimiento del tumor en xenotrasplantes HM7 (Figura 5A) y MV522 (Figura 5B). Se presentan los volúmenes tumorales medios con errores estándar.

[0029] Las Figuras 6A-6B son gráficas que muestran que ALK1.Fc (10 mg/kg) inhibe el crecimiento del tumor en xenotrasplantes C6 (Figura 6A) y Calu6 (Figura 6B). Se presentan los volúmenes tumorales medios con errores estándar.

[0030] La Figura 7 es una gráfica que muestra que ALK1.Fc tiene actividad antitumoral aditiva con anti-VEGF en xenotrasplantes de HM7.

[0031] La Figura 8 es una gráfica que muestra que ALK1.Fc tiene actividad antitumoral aditiva cuando se combina con anti-VEGF en xenotrasplantes de LL2.

[0032] Las Figuras 9A-9D son imágenes confocales que muestran la densidad vascular del tumor en ratones con un modelo de tumor LL2 tratados con PBS (Figura 9A), ALK1.Fc (Figura 9B), anticuerpo anti-VEGF (B20-4.1, 5mg/kg) (Figura 9C) o anticuerpo anti-VEGF y ALK1.Fc (Figura 9D).

[0033] Las Figuras 10A-10B son imágenes confocales de los vellos intestinales de ratones recién nacidos tratados con PBS (Figura 10A) o ALK1.Fc (Figura 10B). Los tejidos se tiñeron con anti-CD31 para mostrar los vasos capilares sanguíneos y con anti-LYVE-1 para mostrar los vasos capilares linfáticos.

[0034] Las Figuras 11A-11B son imágenes confocales de un solo vello intestinal de ratón recién nacido tratado con PBS (Figura 11A) o ALK1.Fc (Figura 11B). Los tejidos se tiñeron con anti-CD31 para mostrar los vasos capilares sanguíneos y con anti-LYVE-1 para mostrar los vasos capilares linfáticos.

[0035] Las Figuras 12A-12F son imágenes confocales de la piel de la cola de ratones recién nacidos tratados con PBS (Figura 12A-C) o ALK1.Fc (Figura 12D-F). Los tejidos se tiñeron con anti-CD31 para mostrar los vasos capilares sanguíneos y con anti-LYVE-1 para mostrar los vasos capilares linfáticos.

[0036] Las Figuras 13A-B son imágenes confocales que muestran la organización de pericitos en ratones con un modelo de tumor TIB68 tratados con PBS (Figura 13A) o ALK1.Fc (Figura 13B)

[0037] La Figura 14 muestra imágenes confocales de las retinas de ratón extraídas el P8 y teñidas con anti-CD31. A ratones se les inyectó PBS, ALK1.Fc, ALK1.Fc.2, ALK1.Fc.4 o ALK1.Fc.5 por vía intraperitoneal el P4 y P6.

[0038] **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

[0039] La práctica de la presente invención empleará, salvo indicación de lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que se encuentran dentro de la técnica conocida. Estas técnicas se explican totalmente en la literatura sobre la materia, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y col., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel y col., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis y col., ed., 1994).

[0040] A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en esta especificación tienen el mismo significado generalmente aceptado como válido en la especialidad a la que pertenece esta invención. Singleton y col., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4ª ed., John Wiley & Sons (Nueva York, NY 1992), ofrecen a los expertos en la materia una guía general para muchos de los términos usados en la presente aplicación.

[0041] Todas las referencias citadas en la misma, incluidas las solicitudes de patentes y publicaciones, quedan incorporadas en su totalidad a modo de referencia.

[0042] ***Definiciones***

[0043] El término "ALK-1" (también llamado indistintamente "quinasa-1 similar al receptor de la activina"), como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere, salvo indicación expresa o salvo que del contexto se desprenda otro sentido, a cualquier polipéptido nativo de ALK-1 o a cualquier variante del polipéptido de ALK-1 (sea nativo o sintético). El término "secuencia nativa" incluye específicamente formas segregadas o truncadas que se producen de forma natural (por ejemplo, una secuencia de un dominio extracelular), las variantes que se producen de forma natural (por ejemplo, formas alternativas de empalme) y las variantes alélicas que se producen de forma natural. Por "ALK-1 de tipo natural" se entenderá generalmente un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de una proteína de ALK-1 que se produce de forma natural. Por "secuencia de ALK-1 de tipo natural" se entenderá generalmente una secuencia de aminoácidos presente en una ALK-1 que se produce de forma natural.

[0044] Una molécula de "ALK-1 quimérica" es un polipéptido que comprende ALK-1 de longitud completa o uno o más dominios del mismo fusionados o unidos al polipéptido heterólogo. La molécula quimérica de ALK-1 generalmente tendrá por lo menos una propiedad biológica en común con la ALK-1 que ocurre naturalmente. Un ejemplo de una molécula quimérica de ALK-1 es aquella que está marcada por un epítopo con fines de purificación. Otra molécula quimérica de ALK-1 es una inmunoadhesina de ALK-1.

[0045] Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "inmunoadhesina" designa moléculas parecidas a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión entre una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que no sea el reconocimiento de un antígeno ni el sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga") y una secuencia del dominio constante de

la inmunoglobulina. La porción de adhesina de una molécula de inmunoadhesina es, generalmente, una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, como por ejemplo las subclases IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

[0046] El término "inmunoadhesina de ALK-1" se usa indistintamente con el término "quimera de inmunoglobulina de ALK-1" y se refiere a una molécula quimérica que combina al menos una porción de una molécula de ALK-1 (nativa o una variante) con una secuencia de inmunoglobulina. En algunos casos, la inmunoadhesina de ALK-1 comprende el dominio extracelular (ECD) de ALK-1 o una porción del mismo capaz de unirse al ligando de ALK-1. En algunas formas de realización el extremo C-terminal de la porción ALK-1 de la inmunoadhesina de ALK-1 puede iniciar en cualquier residuo de aminoácidos de Asp 22 a Ser 27 (inclusive) del identificador de secuencia n.º: 2 y el extremo C-terminal de la porción de ALK-1 de la inmunoadhesina de ALK-1 en cualquier residuo de aminoácidos de Ser 110 a Glu 118 del identificador de secuencia n.º: 2 (inclusive). En algunas formas de realización, la inmunoadhesina ALK-1 comprende residuos de aminoácidos de la inmunoadhesina 1-118 del identificador de secuencia n.º: 2. En algunas formas de realización la inmunoadhesina ALK-1 comprende residuos de aminoácidos 22-118 del identificador de secuencia n.º: 2, residuos 23-118 del identificador de secuencia n.º: 2, residuos 24-118 del identificador de secuencia n.º: 2, residuos 25-118 del identificador de secuencia n.º: 2, residuos 26-118 del identificador de secuencia n.º: 2 o residuos 27-118 del identificador de secuencia n.º: 2. En algunas formas de realización la inmunoadhesina ALK-1 no procesada es ALK1.Fc (identificador de secuencia n.º: 2), ALK1.Fc.2 (identificador de secuencia n.º: 4), ALK1.Fc.3 (identificador de secuencia n.º: 6), ALK1.Fc.4 (identificador de secuencia n.º: 8) o ALK1.Fc.5 (identificador de secuencia n.º: 10). En algunas formas de realización la inmunoadhesina de ALK-1 comprende los residuos de aminoácidos 22-352 del identificador de secuencia n.º: 2, residuos 22-349 del identificador de secuencia n.º: 4, residuos 22-347 del identificador de secuencia n.º: 6, residuos 22-350 del identificador de secuencia n.º: 8 o residuos 22-350 del identificador de secuencia n.º: 10. La secuencia de inmunoglobulina es preferentemente, aunque no necesariamente, un dominio constante de inmunoglobulina (región Fc). Las inmunoadhesinas pueden presentar muchas de las valiosas propiedades químicas y biológicas de los anticuerpos humanos. Como las inmunoadhesinas se pueden construir a partir de una secuencia de proteína humana con una especificidad deseada enlazada a una secuencia del dominio constante (Fc) y de la región bisagra de inmunoglobulina humana, la

especificidad de unión de interés se puede alcanzar utilizando componentes totalmente humanos. Estas inmunoadhesinas presentan una inmunogenicidad mínima para el paciente y son seguras para su uso prolongado o repetido. En algunas formas de realización, la región Fc es una región Fc con una secuencia nativa. En algunas formas de realización, la región Fc es una variante de la región Fc. En algunas formas de realización, la región Fc es una región Fc funcional. La porción ALK-1 y la porción de la secuencia de inmunoglobulina de la inmunoadhesina de ALK-1 se pueden unir por medio de un enlazador mínimo.

[0047] Entre los ejemplos de inmunoadhesinas homomultiméricas que se han descrito para uso terapéutico está la inmunoadhesina CD4-IgG para bloquear la unión del VIH a la superficie celular de CD4. Los datos obtenidos en ensayos clínicos de fase I en los que se administraba CD4-IgG a mujeres embarazadas justo antes del parto, indican que esta inmunoadhesina puede ser útil en la prevención de la transmisión materno-fetal del VIH (Ashkenazi *y col.*, *Intern. Rev. Immunol.* 10:219-227 (1993)). También se ha desarrollado una inmunoadhesina que se une al factor de necrosis tumoral (TNF). El TNF es una citoquina proinflamatoria que se ha demostrado ser un mediador importante del choque séptico. Según un modelo de ratón de choque séptico, una inmunoadhesina de un receptor del TNF ha demostrado ser un prometedor candidato para su uso clínico en el tratamiento del choque séptico (Ashkenazi, A. *y col.*, *PNAS USA* 88:10535-10539 (1991)). El 2 de noviembre de 1998, la Food and Drug Administration estadounidense (FDA) autorizó el uso de ENBREL® (etanercept), una inmunoadhesina que contiene una secuencia del receptor TNF fusionada a una región Fc de IgG, para el tratamiento de la artritis reumatoide. La nueva indicación de ENBREL® para el tratamiento de la artritis reumatoide fue aprobada por la FDA el 6 de junio de 2000. Para obtener información reciente sobre los bloqueadores del TNF, incluido ENBREL®, véase Lovell *y col.*, *N. Engl. J. Med.* 342:763-169 (2000), y el editorial que lo acompaña en las páginas 810-811; y Weinblatt *y col.*, *N. Engl. J. Med.* 340:253-259 (1999); reseñado en Maini *y Taylor*, *Annu. Rev. Med.* 51:207-229 (2000).

[0048] Si los dos brazos de la estructura de la inmunoadhesina presentan especificidades diferentes, la inmunoadhesina se denomina "inmunoadhesina biespecífica" por analogía con los anticuerpos biespecíficos. Dietsch *y col.*, *J. Immunol. Methods* 162:123 (1993) describe este tipo de inmunoadhesina biespecífica combinando los dominios extracelulares de las moléculas de adhesión, E-selectina y P-selectina, donde cada una de estas selectinas está expresada en un tipo de células diferente en la naturaleza. Los estudios acerca de uniones indican que la proteína de fusión de la inmunoglobulina

biespecífica así formada tiene una mayor capacidad de unión a una línea de células mieloides que las inmuno adhesinas monoespecíficas de las que se ha derivado.

[0049] El término "heteroadhesina" se utiliza indistintamente con la expresión "adhesina heteromultimérica quimérica" y hace referencia a un complejo de moléculas quiméricas (secuencias de aminoácidos) en las que cada molécula quimérica combina una porción biológicamente activa, como el dominio extracelular de cada uno de los monómeros del receptor heteromultimérico, con un dominio de multimerización. El "dominio de multimerización" promueve la interacción estable de las moléculas quiméricas dentro del complejo heteromultimérico. Los dominios de multimerización pueden interactuar a través de una secuencia de inmunoglobulina, una cremallera de leucina, una región hidrófoba, una región hidrófila o un tiol libre que forma un puente disulfuro intermolecular entre las moléculas quiméricas del heteromultímero quimérico. El dominio de multimerización puede comprender una región constante de inmunoglobulina. Además, se puede diseñar una región de multimerización de forma que las interacciones de ésteres no sólo promueven una interacción estable, sino que también promueven la formación de heterodímeros más que homodímeros a partir de una mezcla de monómeros. Las "protuberancias" se construyen sustituyendo cadenas laterales cortas de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido por cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptofano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias se crean opcionalmente en la interfaz del segundo polipéptido mediante la sustitución de las cadenas laterales largas de aminoácidos por cadenas más cortas (por ejemplo, alanina o treonina). La secuencia de inmunoglobulina es preferentemente, aunque no necesariamente, un dominio constante de inmunoglobulina. La porción de inmunoglobulina en las quimeras de la presente invención se puede obtener a partir de los subtipos de IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄, IgA, IgE, IgD o IgM, pero preferiblemente de IgG₁ o IgG₃.

[0050] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "región Fc" define una región en el extremo C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y variantes de regiones Fc. A pesar de que los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define normalmente como la extensión que va desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o la Pro230, hasta el extremo carboxi terminal de la misma. La lisina del extremo C terminal (residuo 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición

de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos que tengan todos los residuos K447 numeración de residuos del anticuerpo IgG1 EU humano.

[0051] A menos que se indique lo contrario, en la presente memoria descriptiva la numeración de los residuos de una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU tal como se describe en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), incorporada expresamente a la presente memoria a modo de referencia. Por "índice EU tal como se describe en Kabat" se entiende la numeración del residuo del anticuerpo humano anti-IgG1 según EU.

[0052] Una "región Fc funcional" tiene una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Algunos ejemplos de "funciones efectoras" incluyen la unión al C1q, la citotoxicidad dependiente de complemento, la unión al receptor de Fc, la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis, la regulación descendente de receptores en la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B, BCR), etc. Estas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, el dominio variable de un anticuerpo) y se pueden evaluar mediante diversos ensayos, tal y como se describen en la presente memoria descriptiva, por ejemplo.

[0053] Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácido idéntica a la secuencia de aminoácido de una región Fc que se pueda encontrar en la naturaleza. Las regiones Fc humanas con secuencia nativa incluyen una región Fc de la IgG1 humana con secuencia nativa (alotipos A y no A); región Fc de la IgG2 humana con secuencia nativa; región Fc de la IgG3 humana con secuencia nativa; y región Fc de la IgG4 humana con secuencia nativa, así como las variantes de las mismas que se producen naturalmente.

[0054] La "variante de una región Fc" comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la de una región Fc de secuencia nativa al menos en una modificación de aminoácidos, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la variante de la región Fc tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, aproximadamente entre una y diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente entre una y cinco sustituciones en una región Fc de secuencia nativa o la región Fc del polipéptido parental. La variante de la región Fc de la presente memoria descriptiva tendrá preferentemente al menos un 80 % de homología con relación a una región Fc de secuencia nativa y/o una región Fc de un polipéptido parental, y más preferentemente, al menos un 90 % de homología con las mismas, y más preferentemente

aún, al menos un 95 % de homología con las mismas.

[0055] Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado, y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir en el diagnóstico o los usos terapéuticos del anticuerpo, incluyendo enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos y no proteináceos. En las realizaciones preferentes, el anticuerpo se purificará (1) en más del 95 % de su peso tal como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente, en más del 99 % de su peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia N terminal o interna de aminoácidos mediante un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta alcanzar la homogeneidad mediante SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no reductoras, empleando una tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, plata. Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. En cualquier caso, normalmente el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos un paso de purificación.

[0056] Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en su sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales intactos o de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos polivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos en tanto en cuanto presenten la actividad biológica deseada) y también pueden incluir determinados fragmentos de anticuerpos (como se describe en mayor detalle en la presente memoria descriptiva). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o con maduración de afinidad.

[0057] El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en sus secuencias de un anticuerpo a otro, y se utilizan para la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular con relación a su antígeno particular. De todos modos, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos, denominados regiones de determinación de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables, de los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se llaman la estructura (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cuatro regiones FR que, en su mayor parte, adoptan una configuración de hoja- β , y están conectadas por tres CDR, que crean bucles que conectan la estructura de la hoja- β , y en algunos casos forman parte de ella. Las CDR de cada cadena se mantienen unidas y en estrecha proximidad por las regiones FR y, junto a las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de

unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero desarrollan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

[0058] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno de ellos con un solo sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y sigue siendo capaz de establecer un enlace cruzado con el antígeno.

[0059] El "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y de unión al mismo. En una especie Fv de dos cadenas, esta región está compuesta por un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y otro de la cadena ligera en una estrecha asociación no covalente. En una especie Fv de cadena única, un dominio variable de la cadena pesada y otro de la cadena ligera se pueden enlazar covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible, de forma que las cadenas pesada y ligera se asocien en una estructura "dimérica" análoga a la presente en una especie Fv de dos cadenas. En esta configuración, las tres regiones CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones CDR confieren al anticuerpo una especificidad de unión a antígeno. No obstante, incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprenda únicamente tres regiones CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer un antígeno y unirse a él, aunque con una afinidad inferior a la del sitio de unión completo.

[0060] El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de un anticuerpo. Fab'-SH es la denominación que se da en la presente memoria descriptiva al fragmento Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes presentan un grupo tiol libre. Los fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpos se producían originalmente como pares de fragmentos Fab' con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0061] Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier vertebrado pueden asignarse a una de dos clases claramente diferenciadas, denominadas

kappa (κ) y lambda (λ), en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0062] Según la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a distintas clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden seguir dividiéndose en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las distintas clases de inmunoglobulinas se denominan, α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Son bien conocidas las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las distintas clases de inmunoglobulinas.

[0063] Los "fragmentos de anticuerpos" contienen únicamente una porción de un anticuerpo intacto, en la que la porción conserva al menos una de las funciones normalmente asociadas a esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto, aunque es preferible que conserve la totalidad o la mayoría de estas funciones. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos serían los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, los diacuerpos, los anticuerpos lineales, las moléculas anticuerpos de cadena única y los anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En una forma de realización, un fragmento de anticuerpo contiene un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, de este modo, conserva la capacidad para unirse al antígeno. En otra forma de realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que contiene la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas habitualmente asociadas a la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, como la unión a FcRn, la modulación de la semivida del anticuerpo, la función de la ADCC y la unión a complemento. En una forma de realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que in vivo tiene una semivida sustancialmente similar a la de un anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de este tipo puede contener un brazo de unión a antígeno enlazado a una secuencia Fc capaz de dar estabilidad in vivo al fragmento.

[0064] En la presente memoria descriptiva, el término "región hipervariable", "HVR" o "HV" se refiere a las regiones del dominio variable de un anticuerpo que son hipervariables en su secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Por lo general, los anticuerpos contienen seis regiones hipervariables: tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En la presente memoria descriptiva se usan y engloban diversas delineaciones de regiones hipervariables. Las regiones de determinación de complementariedad (CDR) de Kabat están basadas en la variabilidad de las secuencias y son las más frecuentemente usadas (Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological

Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia, en cambio, se refiere a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de un anticuerpo monoclonal (AbM) representan una solución intermedia entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y son las utilizadas en el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras de cristales complejos disponibles. A continuación, se indican los residuos procedentes de cada una de estas regiones hipervariables.

Asa	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
	-----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(Numeración de Kabat)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Numeración de Chothia)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0065] Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables ampliadas" como se indica a continuación: 24-36 ó 24-34 (L1), 46-56 ó 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 ó 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 ó 95-102 (H3) en la VH. Los residuos de dominio variable están numerados según Kabat y col., como se ha indicado anteriormente, para cada una de estas definiciones.

[0066] Los residuos de una "estructura" o "FR" son aquellos residuos de un dominio variable distintos a los de una región hipervariable, tal como se define en la presente memoria descriptiva.

[0067] El término "anticuerpo monoclonal", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos y/o se unen al mismo o a los mismos epítomos, excepto en el caso de posibles variantes que pudiesen surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, las cuales, por lo general, estarían presentes en cantidades insignificantes. Generalmente dicho anticuerpo monoclonal incluye un anticuerpo que incluye una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en la cual la secuencia polipeptídica unida a una diana se obtuvo

27

mediante un proceso que incluye la selección de una secuencia polipéptida única unida a una diana a partir de una gran variedad de secuencias polipéptidas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon a partir de una gran variedad de clones, como un conjunto de clones de hibridoma, clones de fago o clones recombinantes del ADN. Debería entenderse que la secuencia de unión a una diana seleccionada puede sufrir más alteraciones, por ejemplo, para mejorar la compatibilidad con la diana, para humanizar la secuencia de unión con la diana, para mejorar su producción de cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad in vivo, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a una diana alterada es también un anticuerpo monoclonal de esta invención. Al contrario de las preparaciones de anticuerpos policlonales que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que no suelen estar contaminadas por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo del que se ha obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que sea necesario producir el anticuerpo utilizando un método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilicen de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse a partir de una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975); Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos del ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 4.816.567), tecnología de representación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu y col., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee y col., *J. Mol. Biol.* 340 (5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee y col., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o semejantes a los humanos en animales que tienen partes o la totalidad de los loci inmunoglobulínicos humanos o genes que codifican secuencias de la inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, el documento WO 1998/24893; el documento WO 1996/34096; el documento WO 1996/33735; el documento WO 1991/10741; Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann y col., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); las Patentes de EE.UU. n.º 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm) y 5.545.807; el documento WO 1997/17852; las patentes de EE.UU. n.º

5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016; Marks y col., Bio/Technology, 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., Nature, 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368: 812-813 (1994); Fishwild y col., Nature Biotechnology, 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995).

[0068] Las formas "humanizadas" de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por los residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como el ratón, la rata, el conejo o los primates no humanos, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de estructura (FR) de la inmunoglobulina humana son sustituidos por sus correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentren en el anticuerpo receptor o el donante. Estas modificaciones se llevan a cabo para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables (o al menos uno, y típicamente dos) en los que todos, o sustancialmente todos, los bucles hipervariables correspondan a los de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las FR sean las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente humana. Para obtener más detalles, véase Jones y col., Nature, 321:522-525 (1986), Riechmann y col., Nature, 332:323-329 (1988) y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos y referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994).

[0069] Los anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que las demás cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. n.º 4.816.567 y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Por "anticuerpo humanizado" como se emplea en la presente memoria descriptiva se entiende un subconjunto de

anticuerpos quiméricos.

[0070] Los fragmentos "Fv de cadena simple" o "scFv" de un anticuerpo comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo y estos dominios están presentes en una cadena única de polipéptidos. Por lo general, el polipéptido del scFv comprende también un enlazador de polipéptidos entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, págs. 269-315 (1994).

[0071] Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al que un anticuerpo se puede unir selectivamente. El antígeno objetivo puede ser un polipéptido, un carbohidrato, un ácido nucleico, un lípido, un hapteno o un compuesto de ellos, sintético o producido naturalmente. El antígeno objetivo es, preferiblemente, un polipéptido.

[0072] Por "diacuerpos" se entenderán pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH - VL). Mediante el uso de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el acoplamiento de los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, la patente europea 404.097, el documento WO 93/11161 y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

[0073] Un "anticuerpo humano" es aquel que contiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha elaborado utilizando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos expuestas en la presente memoria descriptiva. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que incluya residuos no humanos de unión al antígeno.

[0074] Un anticuerpo con "maduración de afinidad" es aquél con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan lugar a una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no incluye dicha alteración o alteraciones. Los anticuerpos con maduración de afinidad preferentes tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares con el antígeno objetivo. Los anticuerpos con maduración de afinidad se producen mediante procedimientos bien conocidos en el sector. En Marks et al, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992), se describe la maduración de afinidad a través de la transposición de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de la CDR y/o los residuos de estructura se describen en: Barbas y col., *Proc Nat. Acad.*

Sci, USA, 91:3809-3813 (1994), Schier y col., Gene, 169:147-155 (1995), Yelton y col., J. Immunol., 155:1994-2004 (1995), Jackson y col., J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995) y Hawkins y col., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992).

[0075] Las "funciones efectoras" de un anticuerpo hacen referencia a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de una secuencia nativa o una región Fc variable de una secuencia aminoacídica) de un anticuerpo y puede variar con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de un anticuerpo incluyen: la unión de C1q y citotoxicidad dependiente de complemento, la unión de receptores de Fc, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis, la regulación a la baja de los receptores en la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B) y la activación de las células B.

[0076] La "citotoxicidad dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual una Ig segregada unida a los receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) posibilita que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porte un antígeno y, posteriormente, destruyan dicha célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para dicha destrucción. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, expresan sólo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991). A fin de evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC in vitro, como el que se describe en las patentes de EE.UU. n.º 5.500.362 ó 5.821.337, o se puede realizar el ensayo de Presta que se describe en la patente de EE.UU. n.º 6.737.056. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se encuentran las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las células asesinas naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo animal como el que se detalla en Clynes y col., PNAS (USA), 95:652-656 (1998).

[0077] Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos el FcγRIII y realizan la función efectora de la ADCC. Algunos ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen a las células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC), las células asesinas naturales (NK), los monocitos, las células T citotóxicas y los neutrófilos, aunque se prefieren las células PBMC y NK. Las células efectoras se pueden

aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

[0078] El término "receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano con secuencia nativa. Además, un FcR preferente es aquél que se une a un anticuerpo anti-IgG (un receptor gamma) e incluye las subclases de receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo las variantes alélicas y las formas de empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen el FcγRIIA (un "receptor activador") y el FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), los cuales tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor promotor FcγRIIA contiene en su dominio citoplasmático un motivo promotor inmunorreceptor basado en la tirosina (ITAM). El receptor inhibidor FcγRIIB contiene en su dominio citoplasmático un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en la tirosina (ITIM). (véase reseña M. en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). En Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991), Capel y col., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994) y de Haas y col., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995) también se revisan los FcR. Otros FcRs, incluidos aquellos que se identifiquen en el futuro, se engloban en el término "FcR" empleado en la presente memoria descriptiva. Este término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es el responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer y col., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim y col., *J. Immunol.* 24:249 (1994)) y regula la homeostasis de las inmunoglobulinas.

[0079] El documento WO00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos con capacidad de unión mejorada o disminuida a los FcR. El contenido de esta publicación de patente se incorpora específicamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Shields y col., *J. Biol. Chem.*, 9(2): 6591-6604 (2001).

[0080] Se conocen los métodos de medición de la unión al FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004). La unión al FcRn humano in vivo y la vida media sérica de los polipéptidos de unión al FcRn humano de alta afinidad pueden analizarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan el FcRn humano, o en primates a los que se administran polipéptidos de variante Fc.

[0081] La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula objetivo en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno cognado. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede efectuar un ensayo de CDC, como, por ejemplo, el que se describe en Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods*,

202:163 (1996).

[0082] Las variantes polipeptídicas con secuencias aminoacídicas de la región Fc alteradas y capacidad aumentada o disminuida de unión a Cq1 se describen en la Patente de EE.UU. n.º 6.194.551B1 y el documento WO99/51642. El contenido de dichas publicaciones de patentes se incorpora específicamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Idusogie y col. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

[0083] Por "polipéptido que comprende una región Fc" se entiende un polipéptido, como un anticuerpo o una inmunoadhesina, que comprende una región Fc. La lisina en el extremo C terminal (residuo 447 según el sistema de numeración de EU) de la región Fc puede ser eliminada, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido, o recombinando el ácido nucleico que codifica al polipéptido. Por lo tanto, una composición que contenga un polipéptido con una región Fc según esta invención puede comprender polipéptidos con el K447, con todos los K447 eliminados, o una mezcla de polipéptidos con el residuo K447 o sin él.

[0084] Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas preferentes inhiben de forma sustancial o completa la actividad biológica del antígeno.

[0085] La administración "crónica" se refiere a la administración del agente o agentes de un modo continuo, en contraposición a un modo agudo, para mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo prolongado de tiempo. La administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que tiene carácter cíclico.

[0086] Un "trastorno" o "enfermedad" es un proceso que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Comprende trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluidos los procesos patológicos que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos de trastornos que se tratarán según lo establecido en la presente memoria descriptiva son tumores malignos y benignos, carcinoma, blastoma y sarcoma. Las afecciones asociadas con la linfoangiogénesis anormal o excesiva incluyen, aunque sin limitarse a ellos, tumores, cáncer, trastornos de proliferación celular, degeneración macular, enfermedad mediada por inflamación, artritis reumatoide, retinopatía diabética y psoriasis.

[0087] Los términos "trastorno de proliferación celular" y "trastorno de proliferación" se refieren a trastornos asociados a algún grado de proliferación celular anómala. En una realización, el trastorno de proliferación celular es cáncer.

[0088] En la presente memoria descriptiva, el término "tumor" se refiere a todo

crecimiento y proliferación celular neoplásico, tanto benigno como maligno, así como todos los tejidos y las células cancerosos y precancerosos. Según se usan en la presente memoria descriptiva, los términos "cáncer", "cancerígeno", "trastorno de proliferación celular", "trastorno de proliferación" y "tumor" no se excluyen mutuamente.

[0089] Los términos "cáncer" y "cancerígeno" describen o se refieren al estado fisiológico de los mamíferos típicamente caracterizado por un crecimiento/proliferación celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer figuran, aunque sin limitarse a ellos, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más concretos de estas clases de cáncer son el cáncer de células escamosas, el cáncer de células pulmonares pequeñas, el adenocarcinoma pulmonar, el carcinoma pulmonar escamoso, el cáncer de peritoneo, el cáncer hepatocelular, el cáncer gastrointestinal, el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer de cuello uterino, el cáncer de ovario, el cáncer de hígado, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer colorectal, el carcinoma endometrial o uterino, el carcinoma de las glándulas salivales, el cáncer de riñón, el cáncer de hígado, el cáncer de próstata, el cáncer vulval, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático, el cáncer de estómago, el melanoma y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. La desregulación de la angiogénesis puede ocasionar muchos trastornos que es posible tratar mediante las composiciones y métodos de la invención. Estos trastornos incluyen procesos neoplásicos y no neoplásicos. Los procesos neoplásicos incluyen, pero no se limitan a, los descritos anteriormente.

[0090] Entre los procesos no neoplásicos figuran hipertrofia aberrante o no deseada, artritis, artritis reumatoide (AR), psoriasis, placas psoriáticas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, retinopatía diabética y otras retinopatías proliferativas incluida la retinopatía del prematuro, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular asociada a la edad, edema macular diabético, neovascularización corneal, neovascularización de trasplante de córnea, rechazo de trasplante de córnea, neovascularización retiniana/de la coroides, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, reestenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (MAV), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias de tiroides (incluida la enfermedad de Graves), trasplante de córnea y otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/síndrome de distrés respiratorio del adulto, septicemia, hipertensión pulmonar primaria, efusiones pulmonares malignas, edema cerebral (por ejemplo, asociado a infarto cerebral/traumatismo craneal cerrado/traumatismo), inflamación sinovial, formación de pannus en AR, miositis osificante, formación ósea hipertrófica, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad de ovario poliquístico, endometriosis, enfermedades en el tercer espacio de fluido

(pancreatitis, síndrome compartimental, quemaduras, enfermedad intestinal), fibroides uterinos, parto prematuro, inflamación crónica como enfermedad intestinal inflamatoria (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de trasplante renal, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome nefrítico, crecimiento de masa tisular anómala o no deseada (no-cáncer), articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición de crecimiento del cabello, síndrome de Osler-Weber, granuloma piogénico, fibroplasias retrolentales, escleroderma, tracoma, adherencias vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, derrame pericárdico (como el asociado a pericarditis) y derrame pleural.

[0091] En la presente memoria descriptiva, por "tratamiento" se entiende una intervención clínica en un intento de alterar el proceso natural del individuo o célula tratada y se puede realizar como prevención o durante la evolución de la enfermedad. Son efectos deseables del tratamiento la prevención de la enfermedad o de su recidiva, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución del ritmo de progresión de la enfermedad, la mejora o los cuidados paliativos del estado de la enfermedad y la remisión o un pronóstico de mejoría. En algunas formas de realización, los anticuerpos se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

[0092] Por "sujeto" se entiende un vertebrado, preferiblemente un mamífero y, preferiblemente, un humano. Los mamíferos incluyen, entre otros, animales de granja (como vacas y ovejas), animales utilizados en actividades deportivas, animales de compañía (como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas.

[0093] Para efectos de tratamiento, "mamífero" se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos humanos, animales domésticos y de granja, animales de compañía, utilizados en actividades deportivas o en zoológicos, como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

[0094] Una "cantidad eficaz" es el monto eficaz, en las dosis y durante el tiempo necesario, para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado.

[0095] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista para dar lugar a una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que los efectos tóxicos o perjudiciales de la sustancia/molécula, agonista o antagonista se ven contrarrestados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad eficaz desde el punto de vista profiláctico" es la cantidad eficaz, a las dosis y durante el tiempo necesarios, para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado. En general, aunque no necesariamente, dado que una dosis profiláctica se utiliza en sujetos

antes de la enfermedad o en una etapa temprana, la cantidad eficaz desde el punto de vista preventivo será inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

[0096] El término "agente citotóxico", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa su destrucción. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etoposido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorrubicina u otros agentes intercaladores, enzimas y fragmentos de estas como nucleoliticenzimas, antibióticos y toxinas como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos fragmentos y/o variantes de estos y los diversos agentes antineoplásicos o antitumorales que se describen más adelante. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida ocasiona la destrucción de las células tumorales.

[0097] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen a los agentes alquilantes como la tiotepa y la ciclofosfamida (CYTOXAN®); los sulfonatos de alquilo como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas como la benzodopa, la carbocouona, la meturedopa y la uredopa; las etiloniminas y metilamelaminas incluyendo la altretamina, la trietilenomelamina, la trietilenofosforamida, la trietilenotiofosforamida y la trimetilolomelamina; los acetogeninos (en especial, el bullatacín y la bullatacinona); el delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); la beta-lapachona; el lapachol; las colchicinas; el ácido betulínico, una camptotecina (incluyendo el topotecán análogo sintético (HYCAMTIN®), el CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), la acetilcamptotecina, la escoplectina y la 9-aminocamptotecina); la briostatina; la callistatina; el CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adoclesina, carcelesina y bicelesina); la podofilotoxina; el ácido podofilínico; la teniposida; las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); la eleuterobina; la pancratistatina; una sarcodictina; la espongistatina; los gases nitrógeno como el clorambucil, la clornafacina, la colofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el clorhidrato de óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembichina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida y la uramustina; las nitrosureas como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina y la ranimustina; los antibióticos como los de enedina (por ejemplo, la caliqueamicina, especialmente la caliqueamicina gammaII y la omegaII (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); la dinemicina, incluyendo la

dinemicina A; una esperamicina; el cromóforo de neocarcinostatina y los cromóforos de antibióticos de enedina relacionados con la cromoproteína (las aclacinomicinas, la actinomicina, la autramicina, la azaserina, las bleomicinas, la cactinomicina, la carabicina, la carminomicina, la carcinofilina, las cromomicinas, la dactinomicina, la daunorrubicina, la detorrubicina, la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, la morfolino-doxorrubicina, la cianomorfolino-doxorrubicina, la 2-pirrolino-doxorrubicina y la desoxidoxorrubicina), la epirubicina, la esorrubicina, la idarrubicina, la marcelomicina, las mitomicinas como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la potfiromicina, la puromicina, la quelamicina, la rodorrubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la cinostatina y la zorrubicina); los antimetabolitos como el metotrexato y el 5-fluorouracilo (5-FU); los análogos del ácido fólico como la denopterina, el metotrexato, la teropterina y el trimetrexato; los análogos de la purina como la fludarabina, la 6-mercaptapurina, la tiamiprina y la tioguanina; los análogos de la pirimidina como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofur, la citarabina, la didesoxiuridina, la doxifluridina, la enocitabina y la floxuridina; los andrógenos como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitioestano, el mepitioestano, la testolactona los antiadrenérgicos como la aminoglutetimida, el mitotano y el trilostano; un reabastecedor del ácido fólico como el ácido folínico; la aceglatona; el glucósido aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucil; el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; la elfornitina; el acetato de eliptinio; una epotilona; el etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxiiurea; el lentinán; la lonidainina; los maitansinoides como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; el pentostatín; el fenamet; la pirarrubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidracida; la procarbicina; el complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); el razoxano; la rizoxina; el sizofirán; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaciquona; la 2,2',2"-triclorotrietilamina; los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, el verracurín A, el roridín A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); la dacarbicina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromán; la gacitosina; la arabinosida ("Ara-C"); la tiotepa; los taxoides, por ejemplo, el paclitaxel (TAXOL®) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), la formulación de nanopartículas de paclitaxel mediante ingeniería de albúmina libre de Cremofor (ABRAXANE™) (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y el doxetaxel (TAXOTERE®) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); el clorambucil; la gemcitabina (GEMZAR®); la 6-tioguanina; la mercaptapurina; el metatrexato; los análogos de platino o los basados en platino como el

cisplatino y el carboplatino; la vinblastina (VELBAN®); el platino; el etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la vincristina (ONCOVIN®); el oxaliplatino; la leucovovina; la vinorelbina (NAVELBINE®); la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor RFS 2000 de la topoisomerasa; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides como el ácido retinoico; la capecitabina (XELODA®); las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores, así como las combinaciones de una o más de las sustancias anteriores como la CHOP, la abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y la FOLFOX, la abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

[0098] También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que regulan, reducen, bloquean o inhiben los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer y que se presentan a menudo en forma de un tratamiento sistémico, es decir, que afecta a todo el organismo. Estos pueden ser hormonas. Como ejemplos tendríamos los antiestrógenos y los moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, el tamoxifeno (también el tamoxifeno NOLVADEX®), el raloxifeno (EVISTA®), el droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LY117018, la onapristona y el toremifeno (FARESTON®); las antiprogesteronas; los reguladores a la baja de los receptores de estrógenos (ERD); los agentes que suprimen o cesan la función de los ovarios, por ejemplo, los agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) como el acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), el acetato de goserelina, el acetato de buserelina y la tripterelina; otros antiandrógenos como la flutamida, la nilutamida y la bicalutamida y los inhibidores de la aromatasa que inhiben el enzima aromatasa, encargado de regular la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, como, por ejemplo, las 4(5)-imidazolas, la aminoglutetimida, el acetato de megestrol (MEGASE®), el exemestano (AROMASIN®), la formestania, la fadrozola, la vorozola (RIVISOR®), el letrozol (FEMARA®) y la anastrozola (ARIMIDEX®). Además, esta definición de los agentes quimioterapéuticos incluye los bisfosfonatos como el clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), el etidronato (DIDROCAL®), el NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), el alendronato (FOSAMAX®), el pamidronato (AREDIA®), el tiludronato (SKELID®) o el risedronato (ACTONEL®), así como la troxacitabina (un análogo de la citosina nucleósida 1,3-dioxolano); los oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión génica en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, como, por ejemplo, el PKC-alfa, el Raf, el

H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); las vacunas como THERATOPE® y las que se aplican para terapias génicas, por ejemplo, la ALLOVECTIN®, la LEUVECTIN® y la VAXID®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; el rmRH ABARELIX®; el ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña doble tirosincinasa del ErbB-2 y el EGFR conocido también como GW572016) y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores.

[0099] Por "agente inhibidor del crecimiento" se entenderá, en el contexto de la presente memoria descriptiva, un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula in vitro o in vivo. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede reducir significativamente el porcentaje de células que expresen (como una célula que exprese ALK-1) en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento son los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto distinto de la fase S), como los agentes que inducen la detención de la G1 y la fase M. Entre los bloqueadores típicos de la fase M se incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorrubicina, la epirubicina, la daunorrubicina, el etopósido y la bleomicina. Esos agentes que detienen la G1 también se desbordan en la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes de alquilación del ADN como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbacina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y el ara-C. Se puede encontrar más información al respecto en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami y col., (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente en la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerígenos, derivados ambos del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven la unión de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos al evitar la despolimerización, que ocasiona la inhibición de mitosis en células.

[00100] La "patología" de una enfermedad incluye todos los acontecimientos que ponen en peligro la salud del paciente. En el caso del cáncer, incluyen crecimiento celular anómalo o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de células circundantes, liberación de citoquinas u otros productos secretorios a niveles anómalos, supresión o empeoramiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, etc.

[00101] La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

[00102] Los "vehículos", tal como se utiliza este término en la presente memoria

descriptiva, incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no sean tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos en las dosis y concentraciones empleadas. Con frecuencia, el vehículo con cualidades fisiológicas aceptables es una solución acuosa de pH tamponado. Entre los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables están tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como ácido ascórbico; un polipéptido de bajo peso molecular (inferior a 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, como glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; alcoholes azucarados, como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, como el sodio; o surfactantes no iónicos, como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

[00103] Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o un surfactante que es útil para la administración de un fármaco (como un polipéptido de ALK-1 o un anticuerpo anti-ALK-1) a un mamífero. Por lo general, los componentes del liposoma están dispuestos formando dos capas, de manera similar a la disposición de los lípidos en las membranas biológicas.

[00104] Los términos "VEGF" y "VEGF-A" se utilizan de forma intercambiable para referirse al factor de crecimiento celular endotelial vascular de 165 aminoácidos y a los factores de crecimiento celular endotelial vascular humano relacionados con 121, 145, 183, 189 y 206 aminoácidos, según se describe en Leung y col. Science, 246:1306 (1989), y Houck y col. Mol. Endocrin., 5:1806 (1991), y Robinson & Stringer, Journal of Cell Science, 144(5):853-865 (2001), junto con las formas alélicas naturales y procesadas de los mismos.

[00105] Un "antagonista del VEGF" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular o reducir las actividades del VEGF, o interferir con ellas, incluida su unión a uno o más receptores del VEGF. Los antagonistas del VEGF incluyen los anticuerpos anti-VEGF y los fragmentos de unión a antígeno del mismo, las moléculas receptoras y derivadas que se unen específicamente al VEGF e impiden, así, su unión a uno o más receptores, anticuerpos contra los receptores del VEGF y antagonistas de los receptores del VEGF como inhibidores de molécula pequeña de las tirosinaquinasas del VEGFR y proteínas de fusión, por ejemplo, VEGF-Trap (Regeneron), VEGF121-gelonina (Peregrine). Los antagonistas del VEGF también incluyen variantes antagonistas de VEGF, moléculas antisentido dirigidas al VEGF, aptámeros de ARN y ribozimas contra el VEGF o los receptores del VEGF.

[00106] Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que une al VEGF con afinidad

y especificidad suficientes. El anticuerpo anti-VEGF puede usarse como agente terapéutico para seleccionar e interferir en el desarrollo de enfermedades o procesos que implican actividad del VEGF. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.582.959, 6.703.020; el documento WO98/45332; el documento WO 96/30046; el documento WO94/10202, el documento WO2005/044853; la patente europea EP 0666868B1; las Solicitudes de Patentes de Estados Unidos 20030206899, 20030190317, 20030203409, 20050112126, 20050186208 y 20050112126; Popkov y col., *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004) y el documento WO2005012359. En general, un anticuerpo anti-VEGF no se unirá a otros homólogos de VEGF, tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como PlGF, PDGF o bFGF. El anticuerpo anti-VEGF "Bevacizumab (BV)", también conocido como "rhuMAb VEGF" o "Avastin®", es un anticuerpo recombinante monoclonal anti-VEGF humanizado generado según Presta y col., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997). Incluye regiones estructurales del IgG1 humano mutado y regiones determinantes de la complementariedad de unión del antígeno procedente del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF de la murina A.4.6.1 que bloquea la unión del VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente el 93 % de la secuencia de aminoácidos del Bevacizumab, incluida la mayoría de las regiones estructurales, deriva del IgG1 humano, y aproximadamente el 7 % de la secuencia deriva del anticuerpo murino A4.6.1. El Bevacizumab tiene una masa molecular de aprox. 149.000 daltons y es glicosilado. El Bevacizumab y otros anticuerpos anti-VEGF humanizados, incluido el fragmento del anticuerpo anti-VEGF "ranibizumab", también conocido como "Lucentis®", se describe en mayor detalle en la patente de EE.UU. n.º 6.884.879, publicada el 26 de febrero de 2005.

[00107] Los términos "actividad biológica" y "biológicamente activo" respecto a un polipéptido de ALK-1 se refieren a las propiedades físicoquímicas y a las funciones biológicas asociadas con ALK-1. En algunas formas de realización, la "actividad biológica" de ALK-1 incluye una o más de las siguientes: unión a un ligando de ALK-1, por ejemplo, BMP9 y/o BMP10 o activación de la cascada de señalización molecular de ALK-1, por ejemplo, la fosforilación de Smad 1, Smad5 y/o Smad8.

[00108] Un "antagonista de ALK-1" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir las actividades de ALK-1, incluida, por ejemplo, la reducción o el bloqueo de la activación del receptor de ALK-1, la activación, la reducción o el bloqueo de la cascada de señalización molecular de ALK-1, por ejemplo, la fosforilación de Smad1, Smad5 y/o Smad8, la alteración o el bloqueo del ligando de ALK-1 (por ejemplo, BMP9 o BMP10) que se une a ALK-1. Los antagonistas de ALK-1 incluyen a los anticuerpos y los fragmentos que se unen al antígeno, proteínas, péptidos, glicoproteínas, glicopéptidos, glicolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos,

moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control de transcripción y de traslación, y similares. Los antagonistas también incluyen inhibidores de moléculas pequeñas de una proteína y proteínas de fusión (incluidas las inmunoadhesinas), moléculas de receptores y derivados que se unen específicamente a la proteína, lo que impide la unión a su diana, las variantes de los antagonistas de la proteína, las moléculas de ARNsi que actúan sobre una proteína, las moléculas antisentido dirigidas a la proteína, los aptámeros de ARN y las ribozimas que actúan contra una proteína. En algunas formas de realización, el antagonista de ALK-1 es una molécula que se une a ALK-1 y neutraliza, bloquea, inhibe, elimina o reduce la actividad biológica de ALK-1 o interfiere con ella.

[00109] Por "composición antineoplásica" se entiende una composición útil en el tratamiento del cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, "agente antineoplásico". Ejemplos de agentes terapéuticos (agentes anticancerosos, también denominados "agentes antineoplásicos" en la presente memoria descriptiva) son agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en radioterapia, agentes antiangiogénicos, agentes apoptóticos, agentes antitubulina, toxinas y otros agentes para tratar el cáncer, por ejemplo, anticuerpo neutralizador anti-VEGF, antagonista de VEGF, anti-HER-2, anti-CD20, un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de la tirosinasa), inhibidor de HER1/EGFR, erlotinib, un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplos, anticuerpos neutralizadores) que se une a uno o más de los receptores de ErbB2, ErbB3, ErbB4 o VEGF, inhibidores para tirosinasa de receptores para factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y/o factor de células madre (SCF) (por ejemplo, imatinib, mesilate (Gleevec® Novartis)), TRAIL/Apo2L y otros agentes bioactivos y químicos orgánicos, etc.

[00110] El término "profármaco", tal como se usa en esta solicitud, se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para células tumorales que el fármaco parental y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, páginas 375-382, 615ª Reunión de Belfast (1986) y Stella y col., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt y col., (ed.), páginas 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, entre otros, profármacos con fosfato, profármacos con tiofosfato, profármacos con sulfato, profármacos con péptidos, profármacos modificados con D-aminoácido, profármacos glicosilados, profármacos que contienen beta-lactam, profármacos que contienen

fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, profármacos 5-fluorocitosina y otros profármacos 5-fluorouridina que pueden transformarse en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden ser derivados para obtener un profármaco para su uso en esta invención son los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

[00111] Un "factor o agente angiogénico" es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de los vasos sanguíneos, p.ej. favorece la angiogénesis, el crecimiento celular endotelial, la estabilidad de los vasos sanguíneos, y/o la vasculogénesis, etc. Por ejemplo, los factores angiogénicos incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el VEGF y los miembros de la familia de los VEGF, el P1GF, la familia de los PDGF, la familia del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), los ligandos TIE (Angiopoietinas), las efrinas, la ANGPTL3, la ALK-1, etc. También incluirían a los factores que aceleran la cicatrización de las heridas, como la hormona del crecimiento, el factor-I de crecimiento (IGF-I) similar a la insulina, el VIGF, el factor de crecimiento de la epidermis (EGF), el CTGF y los miembros de su familia, y el TGF- α y el TGF- β . Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003); Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini y col., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por ejemplo, Tabla 1, que enumera los factores angiogénicos); y Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003).

[00112] Un "agente antiangiogénico" o "inhibidor angiogénico" es una sustancia de bajo peso molecular, un polinucleótido (incluyendo, por ejemplo, un ARN inhibidor (ARNi o ARNsi)), un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhiben la angiogénesis, la vasculogénesis o la permeabilidad vascular no deseada, bien directa bien indirectamente. Por ejemplo, un agente antiangiogénico es un anticuerpo u otro antagonista a un agente angiogénico tal como se define anteriormente, por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF, anticuerpos contra receptores del VEGF, pequeñas moléculas que bloquean la señalización de los receptores del VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU11248 (maleato de sunitinib), AMG706, o las descritas en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 2004/113304). Los agentes antiangiogénicos también incluyen inhibidores nativos de la angiogénesis, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (por ejemplo, la Tabla 3 que contiene tratamiento antiangiogénico en el melanoma maligno); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini y col., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por

ejemplo, la Tabla 2 enumera factores antiangiogénicos) y Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003) (por ejemplo, la Tabla 1 recoge antiangiogénicos usados en ensayos clínicos).

[00113] Métodos y composiciones de la invención

[00114] La presente invención se basa en parte en el descubrimiento que los agentes que modulan la vía de ALK-1 (por ejemplo, una inmunoadhesina de ALK-1 o un anticuerpo anti-ALK-1) son capaces de alterar tanto la angiogénesis, como la linfoangiogénesis. En un aspecto, la invención proporciona un método de prevenir la diferenciación de las células epiteliales en una etapa de diferenciación más madura, que incluye el contacto de las células epiteliales con un antagonista de ALK-1. Las células endoteliales pueden ser de cualquier tipo de células endoteliales, por ejemplo, células endoteliales sanguíneas o linfáticas. En otro aspecto, la invención proporciona un método de alteración de la organización de los pericitos, que incluye el contacto de los pericitos con un antagonista de ALK-1. Además, se ha encontrado que tales agentes son capaces de inhibir el crecimiento del tumor, como agente único y en combinación con un antagonista de VEGF. Por ello, los antagonistas de ALK-1 son útiles para el tratamiento de procesos patológicos y trastornos asociados con la angiogénesis, así como con la linfoangiogénesis.

[00115] Se contempla que los antagonistas de ALK-1 puedan utilizarse para tratar o prevenir varias afecciones o trastornos patológicos. La invención incluye un método de inhibición de la linfoangiogénesis utilizando una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, tal como una inmunoadhesina de ALK-1 o un anticuerpo anti-ALK-1, para inhibir la activación de la vía del receptor de ALK-1. En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir la linfoangiogénesis, que comprende la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1 a un sujeto que necesite ese tratamiento.

[00116] Los ejemplos de afecciones o trastornos patológicos asociados con la linfoangiogénesis anormal incluyen, aunque sin limitarse a los siguientes, tumores, cáncer, metástasis de tumores o de cáncer, trastornos de proliferación celular, degeneración macular, enfermedad mediada por inflamación, artritis reumatoide, retinopatía diabética y psoriasis. En un aspecto, la invención proporciona un método de inhibición de la linfoangiogénesis tumoral en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1. Además se proporciona un método de inhibición o prevención de la metástasis del tumor en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1. En algunas formas de realización el sujeto ha desarrollado o está en riesgo de desarrollar metástasis tumoral. Dicha metástasis puede ocurrir en el sistema linfático o en un órgano distante.

[00117] La invención proporciona un método para alterar la organización de los pericitos en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de

un antagonista de ALK-1. En algunas formas de realización el sujeto tiene un tumor, cáncer, un trastorno de proliferación celular, degeneración macular, una enfermedad mediada por la inflamación, artritis reumatoide, retinopatía diabética o psoriasis. En algunas formas de realización la alteración de la organización de los pericitos ocurre en los vasos del tumor de un sujeto que tiene una enfermedad neoplásica, tal como un tumor o cáncer.

[00118] La invención contempla un método de tratamiento de un tumor, cáncer o trastorno de proliferación celular o trastorno neoplásico en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1. En un aspecto, la invención proporciona un método de inhibición del crecimiento tumoral en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1. Los ejemplos de trastornos neoplásicos que se deben tratar con un antagonista de ALK-1 incluyen, pero no se limitan a, los descritos en esta memoria descriptiva bajo los términos "cáncer" y "canceroso".

[00119] Los procesos no neoplásicos sensibles al tratamiento con antagonistas de ALK-1 útiles de la invención incluyen, entre otros, por ejemplo, hipertrofia aberrante o no deseada, artritis, artritis reumatoide (AR), psoriasis, placas psoriáticas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, edema como consecuencia de un infarto de miocardio, retinopatía diabética y otras retinopatías proliferativas incluida la retinopatía del prematuro, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular asociada a la edad, edema macular diabético, neovascularización corneal, neovascularización de trasplante de córnea, rechazo de trasplante de córnea, neovascularización retiniana/de la coroides, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, reestenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (MAV), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias de tiroides (incluida la enfermedad de Graves), trasplante de córnea y otros tejidos, inflamación crónica, inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/síndrome de distrés respiratorio del adulto, hipertensión pulmonar primaria, efusiones pulmonares malignas, edema cerebral (por ejemplo, asociado a infarto cerebral/traumatismo craneal cerrado/traumatismo), inflamación sinovial, formación de paño en AR, miositis osificante, formación ósea hipertrófica, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad de ovario poliquístico, endometriosis, enfermedades en el tercer espacio de fluido (pancreatitis, síndrome compartimental, quemaduras, enfermedad intestinal), fibroides uterinos, parto prematuro, inflamación crónica como enfermedad intestinal inflamatoria (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de trasplante renal, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome nefrítico, crecimiento de masa tisular anómala o no deseada (no cáncer), obesidad, crecimiento de la masa tisular adiposa,

articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición de crecimiento del cabello, síndrome de Osler-Weber, granuloma piogénico, fibroplasias retrolentales, escleroderma, tracoma, adherencias vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, efusión pericárdica (como la asociada a pericarditis) y efusión pleural. Otros ejemplos de trastornos incluyen un trastorno epitelial o cardíaco.

[00120] *Tratamientos combinados*

[00121] Como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona tratamientos combinados en los que un antagonista de ALK-1 (como una inmunoadhesina de ALK-1 o un anticuerpo anti-ALK-1) se administra con otro tratamiento. Por ejemplo, se usan antagonistas de ALK-1 en combinación con agentes antineoplásicos o antiangiogénicos para tratar diversos procesos neoplásicos o afecciones no neoplásicas. En otro ejemplo, los antagonistas de ALK-1 se utilizan en combinación con agentes antilinfoangiogénicos (por ejemplo, un antagonista de VEGFC, tal como un anticuerpo anti-VEGFC). En una forma de realización, el proceso neoplásico o no neoplásico se caracteriza por un proceso patológico asociado a angiogénesis o linfangiogénesis anómala o no deseada. El antagonista de ALK-1 se puede administrar en serie o en combinación con otro agente terapéutico que es eficaz para estos fines, ya sea en la misma composición o como composiciones separadas. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden administrar diversos inhibidores de ALK-1.

[00122] La administración del antagonista de ALK-1 y el otro agente terapéutico (por ejemplo, un agente antineoplásico o antiangiogénico) se puede efectuar simultáneamente, por ejemplo, en composición única o como dos o más composiciones distintas, utilizando la misma vía de administración o vías de administración diferentes. Otra posibilidad, que se puede combinar con lo anterior, es la administración secuencial, en cualquier orden. Otra posibilidad es que estos pasos se sigan secuencial y simultáneamente, combinando un método y otro, en cualquier orden.

[00123] En determinadas formas de realización, pueden transcurrir intervalos de tiempo que oscilen de minutos a días, semanas o meses entre la administración de las dos o más composiciones. Por ejemplo, el agente antineoplásico se puede administrar primero, seguido del antagonista de ALK-1. Sin embargo, también está prevista la administración simultánea o la administración en primer lugar del antagonista de ALK-1. Por ello, en un aspecto, la invención ofrece métodos que incluyen la administración de un antagonista de ALK-1 (como una inmunoadhesina de ALK-1 o un anticuerpo anti-ALK-1), seguido de la administración de un agente antiangiogénico (tal como un antagonista de VEGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF). En una forma de realización, el antiangiogénico es un anticuerpo neutralizador anti-VEGF o fragmento del mismo (por ejemplo A4.6.1

humanizado, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6.582.959, 6.884.879, 6.703.020; el documento WO98/45332; el documento WO 96/30046; el documento WO94/10202; EP 0666868B1; las solicitudes de patente de EE.UU. 20030206899, 20030190317, 20030203409 y 20050112126; Popkov y col., *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004) y el documento WO2005012359.

[00124] Las cantidades eficaces de los agentes terapéuticos administrados en combinación con un antagonista de ALK-1 serán fijadas por el médico o veterinario, según su criterio. La administración y el ajuste de la dosis se realiza para lograr el máximo control de los procesos que se van a tratar. La dosis dependerá, además, de factores como el tipo de agente terapéutico que se vaya a utilizar y el paciente específico que vaya a tratarse. Las dosis adecuadas para cualquiera de los antineoplásicos son aquellas que se utilizan actualmente y se pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) del antineoplásico y el antagonista de ALK-1. En determinadas formas de realización, la combinación de los inhibidores potencia la eficacia de un único inhibidor. El término "potenciar" se refiere a una mejora de la eficacia de un agente terapéutico en su dosis habitual o aprobada. Véase también el apartado *Composiciones farmacéuticas* de la presente memoria descriptiva.

[00125] Típicamente, los antagonistas de ALK-1 y los agentes antineoplásicos son adecuados para las mismas enfermedades o enfermedades similares para bloquear o reducir un proceso patológico como un tumor, un cáncer o un trastorno de proliferación celular. En una forma de realización, el agente antineoplásico es un agente antiangiogénico.

[00126] El tratamiento antiangiogénico en relación con el cáncer es una estrategia de tratamiento para el cáncer destinada a inhibir el desarrollo de vasos sanguíneos tumorales necesario para proporcionar nutrientes que promuevan el crecimiento tumoral. Debido a que la angiogénesis interviene tanto en el crecimiento del tumor primario como en la metástasis, el tratamiento angiogénico proporcionado por la invención es capaz de inhibir el crecimiento neoplásico del tumor en el sitio primario, así como prevenir la metástasis de tumores en sitios secundarios, lo que permite atacar a los tumores con otros agentes terapéuticos.

[00127] Se han identificado muchos otros agentes antiangiogénicos y son bien conocidos en el sector, incluidos los enumerados en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, los enumerados en la sección de *Definiciones* y, por ejemplo, por Carmeliet y Jain, *Nature* 407:249-257 (2000); Ferrara y col., *Nature Reviews:Drug Discovery*, 3:391-400 (2004); y Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003). Véase también la solicitud de patente de EE.UU. n.º US20030055006. En una forma de realización, el antagonista de ALK-1 se

utiliza en combinación con un anticuerpo neutralizador anti-VEGF (o un fragmento del mismo) y/u otro antagonista de VEGF o un antagonista del receptor de VEGF, incluidos, por ejemplo, fragmentos del receptor soluble de VEGF (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropilinas (por ejemplo, NRP1, NRP2)), aptámeros capaces de bloquear el VEGF o el VEGFR, neutralizando los anticuerpos anti-VEGFR, inhibidores de bajo peso molecular de tirosincinasas (RTK) del VEGFR, estrategias antisentido para el VEGF, ribozimas contra el VEGF o receptores del VEGF, variantes de antagonistas del VEGF y cualquier combinación de todos ellos. Alternativamente, o adicionalmente, dos o más inhibidores de la angiogénesis pueden ser opcionalmente administrados conjuntamente al paciente, además del antagonista del VEGF u otro agente. En alguna forma de realización, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, antineoplásicos, se pueden administrar en combinación con un antagonista de ALK-1, el antagonista del VEGF y un agente antiangiogénico.

[00128] En determinados aspectos de la invención, otros agentes terapéuticos útiles para tratamiento neoplásico combinado con un antagonista del ALK-1 de la invención incluyen otros tratamientos contra el cáncer (por ejemplo, tratamiento quirúrgico, radioterapia (por ejemplo, con irradiación o administración de sustancias radiactivas), quimioterapia, tratamiento con antineoplásicos enumerados en la presente memoria descriptiva y conocidos en el sector, o combinaciones de ellos). De manera alternativa o adicional, dos o más anticuerpos que se unen al mismo antígeno o a dos o más antígenos distintos divulgados en la presente memoria descriptiva se pueden administrar conjuntamente al paciente. En ocasiones, puede ser beneficioso administrar también una o más citoquinas al paciente.

[00129] *Agentes quimioterapéuticos*

[00130] En un aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento de un trastorno (como un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular) mediante la administración de cantidades eficaces de un antagonista de ALK-1 (y/o uno o más inhibidores de la angiogénesis) y uno o más agentes quimioterapéuticos. Se pueden usar diversos agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinado de la invención. Una lista no exhaustiva y que puede servir como ejemplo de antineoplásicos se incluye en la presente memoria descriptiva en "*Definiciones*". La administración del antagonista de ALK-1 y el agente quimioterapéutico se puede efectuar simultáneamente, por ejemplo, en composición única o como dos o más composiciones distintas, utilizando la misma vía de administración o vías de administración diferentes. Otra posibilidad, que se puede combinar con lo anterior, es la administración secuencial, en cualquier orden. Otra posibilidad es que estos pasos se sigan secuencial y simultáneamente, combinando un

método y otro, en cualquier orden. En determinadas formas de realización, pueden transcurrir intervalos de tiempo que oscilen de minutos a días, semanas o meses entre la administración de las dos o más composiciones. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico se puede administrar primero, seguido del antagonista de ALK-1. Sin embargo, también está prevista la administración simultánea o la administración en primer lugar del antagonista de ALK-1. Por ello, en un aspecto, la invención ofrece métodos que incluyen la administración de un antagonista de ALK-1 (como una inmunoadhesina de ALK-1 o un anticuerpo anti-ALK-1), seguida de la administración de un agente quimioterapéutico.

[00131] Como comprenderán los expertos en la materia, las dosis apropiadas de agentes quimioterapéuticos estarán en torno a las aquellas ya empleadas en tratamientos clínicos en los que los agentes quimioterapéuticos se administran solos o en combinación con otros quimioterapéuticos. Es probable que la dosis varíe en función del proceso que se esté tratando. El médico que administre el tratamiento será capaz de determinar la dosis apropiada para el sujeto.

[00132] *ALK-1*

[00133] ALK-1 es un receptor de tipo I específico del endotelio de la familia de receptores TGF β . El gen ALK-1 codifica un polipéptido de 503 aminoácidos e incluye un dominio de unión al ligando hidrofílico y rico en cisteína, una región única hidrofóbica transmembrana y una porción del extremo C-terminal intracelular que consiste principalmente en dominios de serina/treonina quinasa. El número de acceso del ALK-1 humano es CAA80255 y el número de acceso del ALK-1 de ratón es CAA83484.

[00134] Las mutaciones del ALK-1 se han asociado con la telangiectasia hemorrágica hereditaria de tipo 2. Durante muchos años el ALK-1 fue un receptor huérfano. A pesar de que anteriormente se especuló que TGF β 1 y TGF β 3 eran ligandos de ALK-1, recientemente se identificó que BMP9 y BMP10 son ligandos fisiológicos del ALK-1 (David, L. y col., Blood 109:1953-1961 (2007)). Se ha demostrado que la activación del ALK-1 induce a la fosforilación de Smad1, Smad5 y Smad8.

[00135] *Antagonistas del ALK-1*

[00136] En la presente memoria descriptiva se incluye una lista no exhaustiva de los antagonistas del ALK-1 (tales como un anticuerpo anti-ALK-1 y una inmunoadhesina del ALK-1) en la sección de "*Definiciones*".

[00137] Los antagonistas de ALK-1 útiles de la presente memoria descriptiva se pueden caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y sus funciones biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la materia. En algunas formas de realización, los

antagonistas del ALK-1 se caracterizan por presentar uno o más de los elementos siguientes: unión al ALK-1, unión a uno o más ligandos de ALK-1, por ejemplo, BMP9 o BMP10, reducción o bloqueo de la activación del receptor de ALK-1, reducción o bloqueo de la cascada de señalización molecular del ALK-1 (por ejemplo, fosforilación del Smad 1, Smad 5 y/o Smad 8), interrupción o bloqueo de la unión de BMP9 o BMP10 al ALK-1, inhibición de la angiogénesis, inhibición de la linfangiogénesis, tratamiento y prevención de un tumor, trastorno de proliferación celular o un cáncer, tratamiento o prevención de un trastorno asociado con la expresión del ALK-1. Los métodos para caracterizar a los antagonistas del ALK-1 son conocidos en la materia y algunos de ellos se describen y ejemplifican en la presente memoria descriptiva.

[00138] *Inmunoadhesinas del ALK-1*

[00139] Las inmunoadhesinas, incluso su estructura y preparación, se describen, por ejemplo, en el documento WO 91/08298 y en las patentes de EE.UU. n.º: 5.428.130 y 5.116.964, cuyo contenido se incorpora expresamente en la presente memoria descriptiva a manera de referencia.

[00140] *Producción de una inmunoadhesina o una adhesina heteromultimérica quimérica*

[00141] La descripción que se incluye a continuación está relacionada principalmente con la producción de inmunoadhesinas mediante células de cultivo transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de inmunoadhesina. Como es de suponer, se tiene en cuenta que se pueden emplear métodos alternativos, bien conocidos en el sector, para preparar inmunoadhesinas. Por ejemplo, se puede producir la inmunoadhesina, o partes de la misma, mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida (véase, por ejemplo, Steward y col., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)). La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar utilizando técnicas manuales o automatizadas. La síntesis automatizada se puede conseguir, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente y por separado diversas porciones de la inmunoadhesina y combinarlas utilizando métodos químicos o enzimáticos para producir la inmunoadhesina de longitud completa.

[00142] El ácido nucleico que codifica una secuencia nativa del receptor ALK-1 puede, por ejemplo, aislarse a partir de células que se conoce que expresan el receptor ALK-1. El número de acceso para la expresión ADNc del ALK-1 humano es Z22533 el número de acceso del ADNc del ALK-1 de ratón es Z31664.1.

[00143] El ADN que codifica las regiones constantes de cadena ligera o liviana se conoce o se encuentra disponible fácilmente en las bibliotecas de ADNc o se sintetiza. Véase, por ejemplo, Adams y col., *Biochemistry* 19:2711-2719 (1980); Gough y col., *Biochemistry* 19:2702-2710 (1980); Dolby y col., *P.N.A.S. USA*, 77:6027-6031 (1980); Rice y col., *P.N.A.S. USA* 79:7862-7865 (1982); Falkner y col., *Nature* 298:286-288 (1982); y Morrison y col., *Ann. Rev. Immunol.* 2:239-256 (1984).

[00144] Una inmunoadhesina o una heteroadhesina quimérica de la presente invención se produce, de preferencia, por la expresión en una célula huésped, de donde se aísla. Una célula huésped generalmente se transforma con el ácido nucleico de la invención. De preferencia, el ácido nucleico se incorpora a un vector de expresión. Las células huésped adecuadas para clonar o expresar los vectores de la presente memoria descriptiva incluyen células huésped procarióticas (tales como *E. coli*, cepas de *Bacillus*, *Pseudomonas* y otras bacterias), levaduras y otros microorganismos eucarióticos y células eucarióticas superiores (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) y células de otros mamíferos). Las células también pueden estar presentes en animales vivos (por ejemplo, en vacas, cabras u ovejas). También se puede utilizar células de insectos. Las metodologías de clonación y expresión también son bien conocidas en la materia.

[00145] Para lograr la expresión de una inmunoadhesina, tal como la molécula ALK1.Fc (se describe en detalle en el Ejemplo 1), se introducen uno o más vectores de expresión a las células huésped por transformación o transfección y las células huésped recombinantes obtenidas se cultivan en medios nutritivos convencionales, modificados según sea adecuado para inducir a los promotores, seleccionando las células recombinantes o amplificando el ADN ALK1.Fc. En general, los principios, los protocolos y las técnicas prácticas para maximizar la productividad *in vitro* de los cultivos celulares de mamíferos se pueden encontrar en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

[00146] *Construcción del ácido nucleico que codifica inmunoadhesinas*

[00147] Al preparar las inmunoadhesinas de la presente invención, de preferencia, el ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de un receptor natural se fusionará en el extremo C-terminal con el ácido nucleico que codifica el extremo N-terminal de una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina; no obstante, también son posibles las fusiones en el extremo N-terminal. Por lo general, en estas fusiones, el polipéptido quimérico codificado conservará al menos una bisagra funcionalmente activa, los dominios CH2 y CH3 de la región constante de una cadena pesada de la inmunoglobulina. Las fusiones también se realizan en el extremo C-terminal de la porción Fc de un dominio constante, o en el extremo N-terminal al CH1 de la cadena pesada o la región

correspondiente de la cadena ligera. El constructo de fusión de ADN resultante se expresa en las células huésped adecuadas.

[00148] Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de dominios extracelulares de secuencia nativa (tales como el dominio extracelular del ALK-1) y/o las secuencias del anticuerpo que se utilizó para preparar la inmunoadhesina deseada, se preparan por varios métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen, sin limitación el aislamiento de una fuente natural o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis de PCR y mutagénesis de módulo de una variante preparada anteriormente o una versión no variante de la secuencia nativa del ALK-1.

[00149] Las variantes de secuencia de los aminoácidos de la secuencia nativa del dominio extracelular incluido en la heteroadhesina quimérica se preparan mediante la introducción de los cambios apropiados en los nucleótidos de la secuencia nativa de ADN del dominio extracelular, o mediante la síntesis *in vitro* del polipéptido monomérico de la heteroadhesina quimérica. Esas variantes incluyen, por ejemplo, deleciones, inserciones o sustituciones en los residuos de la secuencia de aminoácidos de la inmunoadhesina o heteroadhesina quimérica.

[00150] Las variaciones de la secuencia nativa que se describieron anteriormente se pueden realizar mediante técnicas y lineamientos para mutaciones conservadoras y no conservadoras.

[00151] En una forma de realización, el ácido nucleico codifica una molécula quimérica, en la cual la secuencia del dominio extracelular del receptor ALK-1 se fusiona al extremo N-terminal de la porción C-terminal de un anticuerpo (en particular el dominio Fc), con las funciones efectoras de una inmunoglobulina, por ejemplo, IgG₁. Es posible fusionar toda la región constante de la cadena pesada a la secuencia del dominio extracelular del receptor ALK-1. Sin embargo, y más preferentemente, en la fusión se utiliza una secuencia que comienza en la región bisagra justo antes del sitio de escisión mediante papaína (que define químicamente el Fc de la IgG, es decir, el residuo 216, en el que el primer residuo de la región constante de la cadena pesada es 114 (Kobet y col., citado anteriormente), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas). En una forma de realización, la secuencia del dominio extracelular del receptor ALK-1 se fusiona a la región bisagra y CH2 y CH3 o CH1, bisagra, CH2 y CH3 de los dominios de cadena pesada de una IgG₁, IgG₂, o IgG₃. El sitio preciso en el cual ocurre la fusión no es crítico y el sitio óptimo se puede determinar por experimentación de rutina.

[00152] Para las inmunoadhesinas humanas es preferible usar secuencias de inmunoglobulinas IgG₁ e IgG₃. Una ventaja importante de utilizar IgG₁ es que las

inmunoadhesinas de IgG₁ se pueden purificar eficientemente sobre proteína A inmovilizada. En contraste, la purificación de IgG₃ requiere de la proteína G, un medio significativamente menos versátil. Sin embargo, se debe tomar en cuenta otras propiedades estructurales y funcionales de las inmunoglobulinas al elegir al socio de fusión Ig para una construcción de una inmunoadhesina en particular. Por ejemplo, la bisagra de IgG₃ es más larga y flexible, de manera que puede acomodar dominios de "adhesina" más grandes que podrían no plegarse o funcionar adecuadamente al fusionarse a la IgG₁. Otro aspecto a tener en cuenta puede ser la valencia. Las inmunoadhesinas de IgG son homodímeros bivalentes, mientras los subtipos de Ig como IgA e IgM pueden dar origen a estructuras diméricas o pentaméricas, respectivamente de la unidad homodímera básica de la Ig.

[00153] En el caso de las inmunoadhesinas del ALK-1 diseñadas para su aplicación in vivo, las propiedades farmacocinéticas y las funciones efectoras especificadas por la región Fc también son importantes. A pesar de que la IgG₁, IgG₂ e IgG₄ tienen vidas medias in vivo de 21 días, sus potencias relativas al activarse el sistema de complemento son diferentes. La IgG₄ no activa el complemento y la IgG₂ es significativamente más débil que la IgG₁ al activar el complemento. Además, a diferencia de la IgG₁, la IgG₂ no se une a los receptores de Fc de las células mononucleares o de los neutrófilos. Mientras la IgG₃ es optima para la activación del complemento, su vida media in vivo es de aproximadamente un tercio de la vida media de los demás isotipos de IgG.

[00154] Otro aspecto importante a considerar respecto a las inmunoadhesinas diseñadas para su uso terapéutico en humanos es la cantidad de variantes alotípicas del isotipo en particular. Por lo general, son preferibles los isotipos de IgG con menos alotipos definidos serológicamente. Por ejemplo, la IgG₁ tiene solo cuatro sitios alotípicos definidos serológicamente, dos de los cuales (G1m y 2) están ubicados en la región Fc y uno de estos sitios, el G1m1, es no inmunogénico. En contraste, la IgG₃ tiene 12 alotipos definidos serológicamente y todos se encuentran en la región Fc, pero sólo tres de estos (G3m5, 11 and 21) tienen un alotipo no inmunogénico. Por tanto la inmunogenicidad potencial de una inmunoadhesina de IgG₃ es mayor que la de una inmunoadhesina de IgG₁.

[00155] Los ADNc que codifican la secuencia del receptor ALK-1 (por ejemplo, una secuencia de un dominio extracelular) y las partes de Ig de la inmunoadhesina se insertan en tándem en un vector plásmido que dirige una expresión eficaz en las células huésped seleccionadas. Para la expresión en células de mamíferos se pueden utilizar, por ejemplo, vectores basados en pRK5 (Schall y col., Cell 61, 361-370 (1990)) y vectores basados en CDM8 (Seed, Nature 329, 840 (1989)). El sitio de unión exacto se puede crear al remover las secuencias adicionales que existen entre los codones de unión diseñados, usando mutagénesis de delección dirigida a los oligonucleótidos (Zoller y Smith, Nucleic Acids

Res. 10, 6487 (1982); Capon y col., Nature 337, 525-531 (1989)). Se pueden usar oligonucleótidos en los cuales cada mitad es complementaria a la secuencia en cualquier lado del sitio de unión deseado, idealmente éstos son 36 a 48-meros. Como alternativa, se pueden usar las técnicas de PCR para unir las dos partes de la molécula dentro de la estructura con un vector apropiado.

[00156] En una forma de realización, un polipéptido de heteroadhesina quimérica comprende una fusión de un monómero de la heteroadhesina quimérica con un polipéptido marcado que suministra un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo antiseñal. Dichas formas de epítopos marcados de la inmunoadhesina quimérica son útiles, debido a que su presencia puede detectarse usando un anticuerpo marcado contra el polipéptido marcado. Asimismo, el suministro del marcador del epítipo permite que la heteroadhesina quimérica sea fácilmente purificada mediante la purificación de afinidad usando un anticuerpo antiseñal. En la materia se conocen diversos polipéptidos marcados y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen el polipéptido marcado de la gripe HA (flu HA) y su anticuerpo 12CA5 (Field y col., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)); el marcador c-myc y sus anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 (Evan y col., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)) y el marcador de la glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo (Paborsky y col., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)).

[00157] Otro tipo de modificación covalente de un heteromultímero quimérico incluye la unión de un polipéptido del heteromultímero a uno de varios polímeros no proteináceos, *por ejemplo*, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros del polietilenglicol y polipropilenglicol. Un heteromultímero quimérico también se puede atrapar en microcápsulas preparadas, *por ejemplo*, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (*por ejemplo*, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de presentación de fármaco coloidal (*por ejemplo*, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

[00158] *Selección y transformación de células huésped*

[00159] Las células huésped se transfectan o transforman con los vectores de expresión o clonación descritos en la presente memoria descriptiva para la producción de inmunoadhesinas y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados adecuadamente para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Un experto en la materia puede seleccionar sin

experimentación indebida las condiciones de cultivo, como el medio de cultivo, la temperatura, el pH y similares. En general, los principios, los protocolos y las técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., citado anteriormente.

[00160] Después de la transformación o transfección, el ácido nucleico de la invención se puede integrar al genoma de la célula huésped o puede existir como elemento extracromosómico. Los métodos de transfección de células eucarióticas y transformación de células procarióticas son bien conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, electroporación con mediación de liposomas, CaCl_2 y CaPO_4 . Según la célula huésped que se utilice, la transformación se realiza empleando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro cálcico, descrito en Sambrook y col., citado anteriormente, o electroporación se utiliza generalmente para las procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de determinadas células vegetales, como se describe en Shaw y col., Gene, 23:315 (1983) y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin estas paredes celulares, se puede emplear el método de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Se han descrito aspectos generales de las transfecciones del sistema de células huésped de mamíferos en la patente de EE.UU. n° 4.399.216. Las transformaciones en levadura se suelen llevar a cabo según el método de Van Solingen y col., J. Bact., 130:946 (1977) y Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). No obstante, también se pueden utilizar otros métodos para introducir ADN en células, como microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para información de diversas técnicas para la transformación de células de mamífero, véase Keown y col., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour y col., Nature, 336:348-352 (1988).

[00161] Las células anfitrionas adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de la presente memoria descriptiva incluyen células procariotas, de levaduras o eucariotas superiores. Entre las procariotas aptas están las eubacterias, tales como microorganismos grampositivos o gramnegativos, por ejemplo, entero bacteriáceas, como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* están públicamente disponibles, como la cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); la cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células huésped procariotas adecuadas incluyen enterobacterias, como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por

ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P detallada en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos tienen carácter ilustrativo y no limitador. La cepa W3110 es una cepa huésped común para las fermentaciones del producto del ADN recombinante. Preferentemente, la célula anfitriona secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para obtener una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas en el huésped y entre los ejemplos de estos huéspedes están la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa de *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r*; la cepa de *E. coli* W3110 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; la cepa de *E. coli* W3110 40B4, que es la cepa 37D6 con mutación de la delección de *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* con una mutación en una proteasa periplasmática descrita en la Patente de EE.UU. n.º 4.946.783 publicada el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, los métodos *in vitro* de clonación, por ejemplo, PCR u otras reacciones de la polimerasa de ácidos nucleicos, son adecuados.

[00162] Además de procariotas, los microorganismos eucariotas como los hongos filamentosos o la levadura también son aptos como huéspedes para expresión o clonación de los vectores que codifican inmunoadhesinas. Un microorganismo de eucariotas inferiores comúnmente utilizado como huésped es *Saccharomyces cerevisiae*. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290: 140 (1981); Patente europea 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); *Kluyveromyces* hosts (Patente de EE.UU. n.º 4.943.529; Fleer y col., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) como por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y col., J. Bacteriol., 154(2): 737-1742 (1983)), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg y col., Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (Patente Europea 402.226); *Pichia pastoris* (Patente Europea 183.070; Sreekrishna y col., J. Basic Microbiol., 28:265-278 (1988)); *Candida*; *Trichoderma reesia* (Patente Europea 244.234); *Neurospora crassa* (Case y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 (1979)); *Schwanniomyces* como *Schwanniomyces occidentalis* (Patente Europea 394.538 publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y huéspedes *Aspergillus* como *A. nidulans* (Ballance y col., Biochem.

Biophys. Res. Commun., 112:284-289 (1983); Tilburn y col., Gene, 26:205-221 (1983); Yelton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 (1984)) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4:475-479 (1985)). Las levaduras metilotrópicas son adecuadas en la presente memoria descriptiva e incluyen, aunque sin limitarse a, levaduras capaces de crecer en metanol seleccionadas de los géneros formados por *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplos típicos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

[00163] Las células huésped adecuadas para la expresión de inmunoadhesinas glicosiladas se derivan de organismos pluricelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados están las células de insectos como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Los ejemplos de las células huésped de mamíferos adecuadas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) y células COS de mono. Los ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 ó células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham y col., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de pulmón de humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065) y tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). Se considera que la selección de la célula huésped apropiada está dentro de las capacidades de los expertos en la materia.

[00164] En general, la selección de la línea de células huésped de mamífero para la expresión de las inmunoadhesinas ALK-1 depende principalmente del vector de expresión. Otro aspecto a considerar es la cantidad de proteína necesaria. Con frecuencia se pueden producir cantidades en miligramos por las transfecciones transitorias. Por ejemplo, la línea de riñón embrionario humano 293 transformado con adenovirus EIA se puede transfectar transitoriamente con vectores con base en pRK5, mediante una modificación del método de fosfato de calcio para permitir la expresión eficaz de la inmunoadhesina. Los vectores con base en CDM8 se pueden utilizar para transfectar las células COS por el método de DEAE-dextrano (Aruffo y col., Cell 61, 1303-1313 (1990); Zettmeissl y col., DNA Cell Biol. (US) 9, 347-353 (1990)). Si se desea obtener cantidades más grandes de proteínas, la inmunoadhesina se puede expresar después de la transfección estable de una línea de células huésped. Por ejemplo, un vector con base en pRK5 se puede introducir en las células de ovario de hámster chino (CHO) en presencia de un plásmido adicional que codifica hidrofolato reductasa (DHFR) y otorgar resistencia al G418. Los clones resistentes

al G418 se pueden seleccionar por cultivo; estos clones crecen en presencia de niveles que van en aumento del metotrexato inhibidor de DHFR; los clones se seleccionan y la cantidad de copias del gen que codifica el DHFR y las secuencias de inmunoadhesina se coamplifican. Si la inmunoadhesina contiene una secuencia hidrofóbica líder en su extremo N-terminal, probablemente será procesada y secretada por las células transfectadas. La expresión de las inmunoadhesinas con estructuras más complejas puede requerir de células huésped adecuadas de forma única, por ejemplo, componentes tales como una cadena ligera o una cadena J pueden ser suministradas por ciertas células huésped, como mieloma o hibridoma (Gascoigne y col., 1987, citado anteriormente; Martin y col., J. Virol. 67, 3561-3568 (1993)).

[00165] *Selección y uso de un vector replicable*

[00166] El ácido nucleico que codifica inmunoadhesinas puede insertarse en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Diversos vectores están públicamente disponibles. Por ejemplo, el vector puede estar en forma de plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia apropiada de ácidos nucleicos se puede insertar en el vector mediante diversos procedimientos. En general, el ADN se inserta en uno o más sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en la materia. Los componentes del vector suelen incluir, aunque sin limitarse a, una o más secuencias de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de finalización de la transcripción. En la construcción de vectores adecuados que contengan uno o más de estos componentes se emplean técnicas estándar de ligado que los expertos en la materia conocen.

[00167] La inmunoadhesina puede producirse de forma recombinante, no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia de señal u otro polipéptido con un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o el polipéptido. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN que codifica la inmunoadhesina que se inserta en el vector. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilasa, lpp o líderes de enterotoxina II termoestables. Para la secreción de levadura, la secuencia de señal puede ser, por ejemplo, el líder de la invertasa de la levadura, el líder del factor alfa (incluidos los líderes del factor- α *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, este último descrito en la Patente de EE.UU. n.º 5.010.182), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa *C. albicans* (Patente europea 362.179, publicada el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la

expresión de células de mamíferos, las secuencias de señal de mamíferos se pueden utilizar para dirigir la secreción de la proteína, como secuencias de señal procedentes de polipéptidos secretados de la misma especie o de una especie afín, así como líderes secretores virales.

[00168] Los vectores tanto de expresión como clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de la replicación a partir del plásmido pBR322 es apto para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para la levadura y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamíferos.

[00169] Los vectores de expresión y clonación contendrán, por lo general, un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) otorgan resistencia a antibióticos u otras toxinas, como por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas o (c) proporcionan nutrientes importantes que no se encuentran disponibles en medios complejos, como por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

[00170] Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos está formado por aquellos que permiten la identificación de células con capacidad para absorber el ácido nucleico que codifica inmunoadhesinas, como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se emplea el DHFR de tipo natural es la línea celular de CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada como se describe en Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección apto para su uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb y col., Nature, 282:39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7:141 (1979); Tschemper y col., Gene, 10:157 (1980)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n° 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)).

[00171] Los vectores de expresión y clonación suelen contener un promotor enlazado operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que codifican inmunoadhesinas para dirigir la síntesis del ARNm. Los promotores reconocidos por diversas células huésped posibles son bien conocidos. Entre los promotores aptos para su uso con huésped procarióticos están los sistemas promotores de la lactosa y la β -lactamasa (Chang y col., Nature, 275:615 (1978); Goeddel y col., Nature, 281:544 (1979), fosfatasa alcalina, un

sistema promotor del triptofano (trp) (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); Patente Europea 36.776] y promotores híbridos como el promotor tac (deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)). Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno funcionalmente enlazada al ADN que codifica la inmunoadhesina.

[00172] Entre los ejemplos de secuencias de promotores adecuadas para el uso con huéspedes de levadura están los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y col., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)) u otras enzimas glicolíticas (Hess y col., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

[00173] Otros promotores de la levadura, que son promotores inducibles con la ventaja adicional de tener una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones de promotores para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas al metabolismo del nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para el uso en la expresión de levadura se describen con más detalle en la patente europea 73.657.

[00174] La transcripción de la inmunoadhesina a partir de los vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus como el poliomavirus, el virus de la viruela de las aves de corral (Patente de UK n.º 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), el adenovirus (como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el retrovirus (tal como el virus del sarcoma aviario), el citomegalovirus, el virus de la hepatitis B y el virus de simio 40 (SV40), a partir de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, o a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células huésped.

[00175] La transcripción del ADN que codifica la inmunoadhesina mediante eucariotas superiores se puede aumentar al insertar la secuencia de un potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en *cis*, por lo general de entre 10 y 300 bp, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Se conocen ya muchas secuencias de potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). No obstante, lo habitual es que se utilice un potenciador procedente de un virus de células eucarióticas. Entre los ejemplos destacan el potenciador

SV40 en el lado tardío del origen de la replicación (bp 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de la replicación y los potenciadores de adenovirus. El potenciador puede empalmarse en el vector en una posición 5' a 3' a la secuencia de codificación de la inmunoadhesina, pero está situado preferiblemente en un sitio 5' del promotor.

[00176] Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucarióticas (células de levadura, hongos, insecto, planta, animal, humanas o nucleadas procedentes de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la finalización de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Estas secuencias están habitualmente disponibles desde las regiones no traducidas del extremo 3' de los ADN o ADNc virales o eucarióticos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica una inmunoadhesina.

[00177] Otros métodos, vectores y células huésped aptas para adaptación a la síntesis de inmunoadhesinas en cultivos de células de vertebrados recombinantes se describen en Gething y col., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei y col., *Nature*, 281:40-46 (1979); Patentes europeas n.º 117.060 y 117.058.

[00178] *Purificación y caracterización de inmunoadhesinas*

[00179] Una inmunoadhesina o heteroadhesina quimérica se recupera, de preferencia, del medio de cultivo como polipéptido secretado, aunque también se puede recuperar de los lisados de las células huésped. Como primer paso, los desechos de partículas, ya sea de las células huésped o de los fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o por ultrafiltración y opcionalmente se puede concentrar la proteína con filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, seguido de la separación de la heteroadhesina quimérica de otras impurezas por uno o más procedimientos de purificación, que pueden ser: fraccionamiento en una columna de inmunoadfinidad, fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con sulfato de amonio o etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina Sepharose, cromatografía en resina de intercambio catiónico, aniónico, cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y filtración en gel.

[00180] Un método particularmente ventajoso para purificar las inmunoadhesinas es la cromatografía de afinidad. La selección del ligando de afinidad depende de la especie e isotipo del dominio Fc de la inmunoglobulina que se utilice en la quimera. La proteína A se puede utilizar para purificar inmunoadhesinas basadas en cadenas pesadas de IgG₁, IgG₂, o IgG₄ humanas (Lindmark, y col., *J Immunol Meth*, 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y la IgG3 humana (Guss y col., *EMBO J*,

5:15671575 (1986)). La matriz a la que el ligando de afinidad se une suele ser la agarosa, pero también hay disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, como vidrio poroso controlado o poli(estirenodivinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Las condiciones de unión de una inmunoadhesina a la proteína A o G de la columna de afinidad se rigen completamente por las características del dominio Fc, es decir, su especie e isotipo. Usualmente, cuando se elige el ligando apropiado, ocurre la unión eficiente directamente en un líquido de cultivo no acondicionado. Una característica distintiva de las inmunoadhesinas es que para las moléculas de IgG₁ humana, la capacidad de unión de la proteína A disminuye un poco en relación con el anticuerpo del mismo tipo de Fc. La inmunoadhesina unida se puede eluir eficientemente en condiciones de pH ácido (de 3,0 o superior), o en solución tampón de pH neutro que contenga una sal ligeramente caotrópica. Este paso de la cromatografía de afinidad puede dar como resultado una preparación de inmunoadhesina con una pureza >95 %.

[00181] Se pueden utilizar otros métodos conocidos en lugar de, o además de la cromatografía de afinidad de la proteína A o G para purificar las inmunoadhesinas. Las inmunoadhesinas se comportan de manera similar a los anticuerpos en la cromatografía de gel tiofilico (Hutchens y Porath, Anal. Biochem. 159, 217-226 (1986)) y en la cromatografía de quelantes metálicos inmovilizados (Al-Mashikhi y Makai, J. Dairy Sci. 71, 1756-1763 (1988)). En contraste con los anticuerpos, sin embargo, su conducta en las columnas de intercambio iónico se rige no sólo por sus puntos isoelectricos, sino por un dipolo de carga que puede existir en las moléculas, debido a su naturaleza quimérica.

[00182] La preparación de inmunoadhesinas marcadas con epítomos facilita la purificación en columna de inmunoadfinidad que contenga un anticuerpo del epítomo para adsorber el polipéptido de fusión.

[00183] En algunas formas de realización, las inmunoadhesinas de ALK-1 se ensamblan como monómeros, hetero- u homo-multímeros, dímeros o tetrámeros, similares a los ilustrados en el documento WO 91/08298. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras de unidades conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la que existen la IgG, la IgD y la IgE. Una estructura de cuatro unidades se repite en las inmunoglobulinas de peso molecular más alto; la IgM suele existir en forma de pentámero de cuatro unidades básicas que se mantienen unidas por puentes disulfuro. La globulina IgA y, ocasionalmente, la globulina IgG, pueden existir también en forma multimérica en el suero. En el caso de un multímero, las cuatro unidades pueden ser iguales o distintas.

[00184] Usualmente, las inmunoadhesinas del ALK-1 de la presente invención

tendrán una o más de las siguientes propiedades: capacidad de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades del ALK-1, que incluyen, por ejemplo, la reducción o el bloqueo de la activación del receptor del ALK-1, la reducción o el bloqueo de la cascada de señalización molecular del ALK-1, por ejemplo, la fosforilación de Smad1, Smad5 y/o Smad8, la alteración o el bloqueo del ligando del ALK-1 (por ejemplo, BMP9 o BMP10) que se une al ALK-1.

[00185] *Anticuerpos*

[00186] En una realización, los anticuerpos anti-ALK-1 son monoclonales. También dentro del ámbito de la invención, están fragmentos de anticuerpos como los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')₂, de los anticuerpos anti-ALK-1 proporcionados en la presente memoria descriptiva. Estos fragmentos de anticuerpos se pueden crear por medios tradicionales, como digestión enzimática, o se pueden generar mediante técnicas recombinantes. Dichos fragmentos de anticuerpos pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para los fines diagnósticos y terapéuticos que se exponen a continuación.

[00187] Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos excepto en posibles mutaciones de formación natural que podrían estar presentes en cantidades insignificantes. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos diferenciados.

[00188] Los anticuerpos monoclonales anti-ALK-1 se pueden obtener utilizando el método del hibridoma, descrito por primera vez en Kohler y col., Nature, 256:495 (1975), o métodos de ADN recombinante (patente de EE.UU. n° 4.816.567).

[00189] En el método del hibridoma, un ratón u otro animal anfitrión apropiado, como un hámster, se inmuniza para obtener linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Los anticuerpos anti-ALK-1 se producen generalmente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de ALK-1 y un adyuvante. El ALK-1 se puede preparar usando métodos bien conocidos en la materia, algunos de los cuales se describen con más detalle en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, la producción recombinante de ALK-1 se describe más adelante. En una forma de realización, se inmuniza a los animales con un derivado de ALK-1 que contiene el dominio extracelular (ECD) de ALK-1 fusionado a la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En otra forma de realización, se inmuniza a los animales con una proteína de fusión ALK-1-IgG₁. Los animales suelen ser inmunizados contra conjugados inmunogénicos o derivados de ALK-1, con monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato

de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) y la solución se inyecta intradérmicamente en múltiples puntos. Dos semanas más tarde, los animales reciben dosis de recuerdo. Entre 7 y 14 días después, se extrae sangre a los animales y el suero se analiza para titular los anticuerpos anti-ALK-1. Los animales reciben dosis de recuerdo hasta obtener los niveles adecuados de titulación.

[00190] De manera alternativa, los linfocitos pueden ser inmunizados in vitro. Después, los linfocitos se fusionan con las células de mieloma utilizando un agente fusionador adecuado, como glicol de polietileno, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)).

[00191] Las células de hibridoma preparadas de esta forma se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales no poseen la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células con déficit de HGPRT.

[00192] Las células de mieloma preferentes son aquéllas que se fusionan eficazmente, soportan altos niveles estables de producción de anticuerpos por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio como el HAT. Entre estas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, como aquellas derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, en San Diego, California, EE.UU. y las células SP-2 o X63-Ag8-653, disponibles en el American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo), en Rockville, Maryland, EE.UU. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

[00193] El medio de cultivo en el cual crecen las células de hibridoma se analiza para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el ALK-1. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma está determinada por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión in vitro, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA).

[00194] La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por

ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y col., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

[00195] Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y pueden crecer mediante procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medios D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer en vivo en un animal como tumores con ascitis.

[00196] Los anticuerpos monoclonales que los subclones secretan se separan adecuadamente del medio de cultivo, los fluidos ascíticos o el suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, como por ejemplo, la proteína A-sefara, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

[00197] Los anticuerpos anti-ALK-1 se pueden obtener utilizando librerías combinatorias para detectar clones de anticuerpos sintéticos con la actividad o actividades deseadas. En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan examinando bibliotecas de fagos que presentan diversos fragmentos de la región variable (Fv) de anticuerpos fusionados a una proteína de revestimiento fágico. Estas bibliotecas de fagos se criban mediante cromatografía de afinidad para detectar el antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y, de este modo, se separan de los clones de la biblioteca que no tienen capacidad de unión. Los clones con capacidad de unión se eluyen entonces del antígeno y pueden enriquecerse aún más mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Cualquiera de los anticuerpos anti-ALK-1 se puede obtener diseñando un procedimiento apropiado para examinar antígenos para seleccionar el clon del fago de interés, seguido de la construcción de un clon del anticuerpo anti-ALK-1 de longitud completa utilizando las secuencias de Fv del clon del fago de interés y secuencias adecuadas de la región constante (Fc), descritas en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, publicación de los NIH n.º 91-3242, Bethesda, MD (1991), volúmenes 1-3.

[00198] El dominio de unión al antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de unos 110 aminoácidos, una correspondiente a la cadena ligera (VL) y otra a la pesada (VH), que presentan en ambos casos tres bucles hipervariables o regiones de determinación de la complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden representar funcionalmente en el fago, bien como fragmentos de Fv de cadena única (scFv), en los que VH y VL estén covalentemente enlazados por medio de un péptido corto y flexible, o como fragmentos Fab, en los que estén fusionados a un dominio constante e

interactúan no covalentemente, como se describe en Winter y col., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en la presente memoria descriptiva, los clones de fagos que codifican scFv y los clones de fagos que codifican Fab se denominan colectivamente "clones de fagos Fv" o "clones Fv".

[00199] Los repertorios de genes de VH y VL se pueden clonar por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinar aleatoriamente en librerías de fagos, en las que se puede buscar por clones de unión a antígeno, como se describe en Winter y col., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas procedentes de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin necesidad de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio virgen se puede clonar para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos a una gran variedad de antígenos extraños y también de autoantígenos sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths y col., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Por último, las librerías vírgenes también se pueden producir sintéticamente mediante la clonación de segmentos de genes V no reorganizados procedentes de células madre y utilizando cebadores de la PCR que contengan secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 muy variables y para conseguir la reorganización in vitro como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

[00200] El fago filamentosos se utiliza para representar fragmentos de anticuerpos mediante fusión a la proteína de la cápside menor pIII. Los fragmentos de anticuerpos se pueden representar como fragmentos Fv de cadena única, en los que los dominios de VH y VL están conectados a la misma cadena polipeptídica mediante un separador de polipéptidos flexible, como se describe en Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona a pIII y la otra se segrega en el periplasma del anfitrión celular bacteriano donde el ensamblaje de una estructura proteínica de la cápside de Fab se representa en la superficie del fago mediante el desplazamiento de las proteínas de la cápside de tipo natural, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom y col., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

[00201] En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen a partir de inmunocitos recolectados de humanos o animales. Si se desea una biblioteca que presente un sesgo a favor de clones anti-ALK-1, el sujeto se inmuniza con ALK-1 para generar una respuesta a anticuerpos y las células esplénicas o los linfocitos B circulantes u otros linfocitos de la circulación periférica (PBL) se recuperan para la construcción de la biblioteca. En una forma de realización preferente, una biblioteca de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgada a favor de clones de anti-ALK-1 humano se obtiene al generar una respuesta a un anticuerpo anti-ALK-1 en

ratones transgénicos portadores de una matriz de genes humanos funcionales de la inmunoglobulina (y carentes de un sistema funcional de producción de anticuerpos endógenos), de forma que la inmunización con ALK-1 da lugar a células B productoras de anticuerpos humanos anti-ALK-1. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe más adelante.

[00202] El enriquecimiento adicional de poblaciones celulares reactivas a anti-ALK-1 se puede obtener mediante un procedimiento de detección adecuado para aislar linfocitos B que expresen un anticuerpo unido a membrana específico de ALK-1, por ejemplo, mediante separación celular con cromatografía de afinidad a ALK-1 o adsorción de células a ALK-1 marcada con fluorocromo seguida de separación de células activadas por fluorescencia (FACS).

[00203] Alternativamente, el uso de células esplénicas y/o linfocitos B u otros PBL procedentes de un donante no inmunizado ofrece una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que ALK-1 no es antigénico. En el caso de bibliotecas que incorporen la construcción de genes de anticuerpos in vitro, las células madre se recolectan del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifiquen segmentos de genes de anticuerpos no organizados. Los inmunocitos de interés se pueden obtener de diversas especies animales, como el ser humano, el ratón, la rata y las especies lagomorfos, lupinas, caninas, felinas, porcinas, bovinas, equinas, aviares, etc.

[00204] Los segmentos de regiones variables de genes de anticuerpos que codifican ácidos nucleicos (incluyendo los segmentos VH y VL) se recuperan a partir de las células de interés y se amplifican. En el caso de librerías de genes de VH y VL reorganizadas, el ADN deseado se puede obtener aislando el ADN o el ARNm genómico de los linfocitos, seguido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que se acoplen a los extremos 5' y 3' de los genes de VH y VL reorganizadas, como se describe en Orlandi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), lo que permite obtener diversos repertorios de genes V para su expresión. Los genes V se pueden amplificar a partir del ADNc y ADN genómico, con cebadores reversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores anversos dentro del segmento J, como se describe en Orlandi y col. (1989) y Ward y col., Nature, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir del ADNc, los cebadores reversos también se pueden situar en el exón líder, como se describe en Jones y col., Biotechnol., 9: 88-89 (1991), y los cebadores anversos dentro de la región constante, como se describe en Sastry y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se

puede incorporar la degeneración en los cebadores, como se describe en Orlandi y col. (1989) o Sastry y col. (1989). Preferiblemente, la diversidad de las librerías se maximiza utilizando cebadores de la PCR dirigidos a cada familia de genes V para amplificar todas las organizaciones disponibles de VH y VL presentes en la muestra de ácidos nucleicos de inmunocitos, por ejemplo, como se describe en el método de Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum y col., nucleico Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, se pueden introducir sitios de restricción poco habituales dentro del cebador de la PCR como una señalización en un extremo, según se describe en Orlandi y col. (1989), o mediante una nueva amplificación de la PCR con un cebador señalizado, como se describe en Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991).

[00205] A partir de segmentos de genes V se pueden derivar *in vitro* repertorios de genes V sintéticamente reorganizados. La mayoría de los segmentos de genes VH humanos se han clonado y secuenciado (según Tomlinson y col. J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), y mapeado (explicados en Matsuda y col., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluidas todas las principales conformaciones del bucle H1 y H2) se pueden utilizar para generar diversos repertorios de genes VH con cebadores de la PCR que codifican bucles de H3 de secuencia y longitud diversas, como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Los repertorios de VH también se pueden producir con toda la diversidad de secuencias centrada en un bucle de H3 largo de una longitud única, como se describe en Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos de V κ y V λ humanos se han clonado y secuenciado (explicado en Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y se pueden utilizar para hacer repertorios sintéticos de la cadena ligera. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en una gran variedad de dominios de VH y VL, y longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de considerable diversidad estructural. Tras la amplificación de los ADN codificadores de genes V, los segmentos de genes V de línea germinal se pueden reorganizar *in vitro* según los procedimientos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

[00206] Se pueden construir repertorios de fragmentos de anticuerpos mediante combinación de repertorios de genes de VH y VL juntos de varias formas. Cada repertorio se puede crear en vectores diferentes y los vectores se pueden recombinar *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe y col., Gene, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse y col., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). El procedimiento de la recombinación *in vivo* se aprovecha de las dos cadenas de los fragmentos Fab para superar el límite en el

tamaño de la biblioteca impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL vírgenes se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector fágico. A continuación, se combinan las dos bibliotecas mediante infección fágica de bacterias que contienen fagémidos, de forma que cada célula contiene una combinación distinta y el tamaño de la biblioteca sólo está limitado por el número de células presente (unos 10^{12} clones). Los dos vectores contienen señales de recombinación *in vivo*, por lo que los genes VH y VL se recombinan en un único replicón y se introducen en viriones fágicos. Estas enormes bibliotecas proporcionan gran número de diversos anticuerpos con buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^8 M).

[00207] Alternativamente, los repertorios se pueden clonar secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblar juntos mediante PCR y, luego, clonarlos, como se describe en Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje mediante PCR también se puede utilizar para unir los ADN de VH y VL con un ADN que codifique un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv de cadena única (scFv). En otra técnica, "el ensamblaje mediante PCR en el interior de la célula" se usa para combinar genes de VH y VL dentro de linfocitos mediante PCR y, luego, clonar repertorios de genes enlazados, como se describe en Embleton y col., *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

[00208] Los anticuerpos producidos por bibliotecas vírgenes (sean naturales o sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹), pero la maduración de la afinidad también se puede imitar *in vitro* construyendo bibliotecas secundarias y volviendo a seleccionar en ellas, como se describe en Winter y col., citado anteriormente, (1994). Por ejemplo, la mutación se puede introducir aleatoriamente *in vitro* utilizando polimerasa con tendencia al error (explicado en Leung y col., *Technique*, 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins y col., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992). Asimismo, la maduración de la afinidad se puede realizar mutando de forma aleatoria una o más CDR, por ejemplo, mediante PCR con cebadores portadores de secuencias aleatorias que abarquen la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados, y examinando clones de mayor afinidad. En el documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) se describió un método para inducir la mutagénesis en una región de determinación de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulinas para crear una biblioteca de genes de cadena ligera. Otro método eficaz consiste en recombinar los dominios de VH o VL seleccionados por representación en fagos con repertorios de variantes de dominio V que se producen naturalmente obtenidos a partir de donantes no inmunizados y detectar los de mayor afinidad en varias series de nueva transposición de

cadena, como se describe en Marks y col., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades del orden de 10^{-9} M.

[00209] Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de ALK-1 son conocidas en el sector y se abordan más adelante en la presente memoria descriptiva. Los ADN que codifican la ALK-1 se pueden preparar mediante diversos métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen la síntesis química mediante cualquiera de los métodos descritos en Engels y col., *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28: 716-734 (1989), como los métodos de triéster, fosfito, fosforamidita y H-fosfonato. En una forma de realización, los codones preferidos por la expresión de células huésped se usan en el diseño del ADN que codifica el ALK-1. Otra alternativa es aislar el ADN que codifica el ALK-1 a partir de una biblioteca de ADNc o genómico.

[00210] Tras la construcción de la molécula de ADN que codifica la ALK-1, la molécula de ADN se enlaza funcionalmente a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión, como un plásmido, en la que la secuencia de control es reconocida por una célula huésped transformada con el vector. En general, los vectores plásmidos contienen secuencias de control y replicación derivadas de especies compatibles con la célula anfitrión. Por lo general, el vector porta un sitio de replicación, así como secuencias que codifican proteínas capaces de proporcionar una selección fenotípica en células transformadas. Los vectores aptos para la expresión en células huésped procarióticas y eucarióticas son bien conocidos en el campo y algunos se describen con mayor detalle en la presente memoria descriptiva. Se pueden usar organismos eucarióticos, como las levaduras, o células derivadas de organismos pluricelulares, como los mamíferos.

[00211] Opcionalmente, el ADN que codifica el ALK-1 se enlaza funcionalmente a una secuencia líder secretora, lo que origina la secreción del producto de expresión por la célula huésped en el medio de cultivo. Ejemplos de secuencias de líderes secretores son stII, ecotina, lamB, herpes GD, lpp, fosfatasa alcalina, invertasa y factor alfa. También es apta para su uso en la presente memoria descriptiva la secuencia líder de 36 aminoácidos de la proteína A (Abrahmsen y col., *EMBO J.*, 4: 3901 (1985)).

[00212] Las células huésped se transfectan y preferentemente transforman con los vectores de expresión o clonación de esta invención anteriormente descritos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados apropiadamente para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[00213] Por transfección se entiende la captación de un vector de expresión por parte de una célula anfitrión, con independencia de que se expresen realmente o no secuencias de codificación. Normalmente, los expertos conocen numerosos métodos de transfección,

como por ejemplo, precipitación y electroporación de CaPO_4 . Por lo general, el éxito de una transfección se reconoce cuando se manifiesta dentro de la célula anfitrión cualquier indicación del funcionamiento de este vector. Los métodos de transfección son bien conocidos en la materia y algunos se describen con mayor detalle en la presente memoria descriptiva.

[00214] Transformación significa introducir ADN en un organismo de forma que el ADN sea replicable, ya sea como elemento extracromosómico o integrante cromosómico. Según la célula anfitrión que se utilice, la transformación se realiza empleando técnicas estándar apropiadas para dichas células. Los métodos de transformación son bien conocidos en la materia y algunos se describen con mayor detalle en la presente memoria descriptiva.

[00215] Las células huésped procarióticas usadas para producir el ALK-1 se pueden cultivar como se describe en términos generales en Sambrook y col., como se indica anteriormente.

[00216] Las células huésped de mamíferos usadas para producir el ALK-1 se pueden cultivar en diversos medios, que son bien conocidos en el sector y algunos de los cuales se describen en la presente memoria descriptiva.

[00217] Las células huésped mencionadas en esta memoria engloban células en cultivo in vitro, así como células que están dentro de un animal anfitrión.

[00218] La purificación de ALK-1 se puede lograr utilizando métodos reconocidos en este ámbito, algunos de los cuales se describen en esta memoria descriptiva.

[00219] El ALK-1 purificada se puede unir a una matriz adecuada como partículas de agarosa, partículas de acrilamida, partículas de vidrio, celulosa, diversos copolímeros acrílicos, geles de metacrilato de hidroxilo, copolímeros poliacrílicos y polimetacrílicos, nailon, moléculas vehículo neutras e iónicas y similares, para uso en la separación mediante cromatografía de afinidad de clones de representación de fagos. La unión de la proteína de ALK-1 a la matriz se puede conseguir mediante los métodos descritos en *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Una técnica comúnmente empleada para unir ligandos de proteínas a matrices de polisacáridos, por ejemplo, agarosa, dextrano o celulosa, supone la activación del vehículo con halidos cianógenos y el acoplamiento subsiguiente de las aminas primarias alifáticas o aromáticas del ligando peptídico a la matriz activada.

[00220] Alternativamente, ALK-1 se puede utilizar para el revestimiento de los pocillos de placas de adsorción, expresar en células huésped fijadas a placas de adsorción o usadas en la clasificación celular, conjugar con biotina para captura con partículas revestidas de estreptavidina o emplear en cualquier otro método conocido en la materia para cribar bibliotecas de presentación en fagos.

[00221] Las muestras de bibliotecas de fagos están en contacto con ALK-1

inmovilizado en condiciones aptas para la unión de al menos una porción de las partículas de fagos con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo el pH, la concentración iónica, la temperatura y similares, se seleccionan de forma que imiten condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y, luego, se eluyen mediante ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), o mediante álcali, por ejemplo como se describe en Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o mediante competencia antigénica con ALK-1, por ejemplo, en un procedimiento similar al procedimiento de competición antigénica de Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer de 20 a 1.000 veces en una única serie de selección. Además, los fagos enriquecidos se pueden cultivar en cultivos bacterianos y someterse a nuevas series de selección.

[00222] La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluida la cinética de la disociación durante el lavado y si múltiples fragmentos de anticuerpos de un único fago se pueden unir simultáneamente a un antígeno. Los anticuerpos con rápida cinética de disociación (y afinidades de unión débiles) se pueden conservar mediante el uso de lavados cortos, presentación en fagos multivalentes y alta densidad de revestimiento del antígeno en fase sólida. La densidad elevada no sólo estabiliza al fago durante las interacciones multivalentes, sino que, además, favorece de nuevo la unión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) se puede promover mediante el uso de largos lavados y representación en fagos monovalentes, como se describe en Bass y col., Proteins, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de revestimiento del antígeno como se describe en Marks y col., Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

[00223] Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos de distintas afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, para ALK-1. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como la que se realiza en algunas de las técnicas de maduración de afinidad, descritas anteriormente) es probable que ocasione muchos mutantes, la mayoría de unión a antígeno, y unos cuantos con afinidad más alta. Con un ALK-1 limitado, es raro que se pudieran completar fagos de alta afinidad. Para conservar todos los mutantes de afinidad más alta, los fagos se pueden incubar con una cantidad mayor del ALK-1 biotinilado, pero con el ALK-1 biotinilado a una concentración de molaridad menor a la de la constante de afinidad molar blanco para el ALK-1. Los fagos con afinidad de unión más alta pueden, entonces, ser capturados por partículas paramagnéticas revestidas de estreptavidina. Esta "captura en equilibrio" permite seleccionar los anticuerpos según sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permite aislar clones mutantes con una afinidad tan sólo dos veces mayor de un gran exceso de

fagos con afinidad menor. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también se pueden manipular para distinguirlos en función de la cinética de disociación.

[00224] Los clones anti-ALK-1 se pueden seleccionar por actividad. En una forma de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-ALK-1 que reducen o bloquean la actividad del receptor ALK-1, reducen o bloquean la cascada de señalización molecular de ALK-1, por ejemplo, la fosforilación de Smad1, Smad5 y/o Smad8 o interrumpir o bloquear la unión del ligando de ALK-1 (por ejemplo, BMP9 o BMP10) al ALK-1.

[00225] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o los clones de Fv con presentación en fagos se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante cebadores de oligonucleótidos diseñados para amplificar específicamente las regiones de interés que codifican las cadenas ligera y pesada de plantillas de ADN de fagos o hibridoma). Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan en células huésped, como por ejemplo las células de E. coli, las células COS de monos, las células de ovario de hámster chino (CHO) o las células de mieloma que, de otro modo, no producen la proteína de la inmunoglobulina, a fin de obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias del ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

[00226] El ADN que codifica los clones de Fv se puede combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican las regiones constantes de la cadena ligera y/o pesada (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas se pueden obtener según Kabat y col., citado anteriormente) para formar clones que codifiquen cadenas ligeras y/o pesadas de longitud total o parcial. Se tendrá en cuenta que las regiones constantes de cualquier isótopo se pueden utilizar para este fin, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y obtener de cualquier humano o especie animal. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" se incluye un clon de Fv derivado del ADN del dominio variable de una especie animal (por ejemplo, un humano) y, luego, fusionado al ADN de la región constante de otra especie animal para formar una o más secuencias de codificación para cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa e "híbridas". En una forma de realización preferente, un clon de Fv derivado de ADN variable humano se fusiona con ADN humano de región constante para formar una o más secuencias de codificación para todas las cadenas pesadas y/o ligeras de longitud parcial o completa y humanas.

[00227] El ADN que codifica un anticuerpo anti-ALK-1 derivado de un hibridoma

también se puede modificar, por ejemplo, mediante sustitución de las secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma por la secuencia de codificación para los dominios constantes de la cadena ligera y pesada humanas (por ejemplo, como en el método de Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de un clon de Fv o un hibridoma se puede modificar a su vez mediante la unión covalente a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina de la totalidad o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido que no sea inmunoglobulina. De este modo, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de los anticuerpos derivados de un clon de hibridoma o Fv.

[00228] *Fragmentos de anticuerpos*

[00229] La presente invención comprende fragmentos de anticuerpos. En determinadas circunstancias, resulta ventajoso utilizar fragmentos de anticuerpos en lugar de anticuerpos enteros. El tamaño menor de los fragmentos permite una eliminación rápida y puede brindar mejor acceso a los tumores sólidos.

[00230] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan y col., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden expresarse todos en E. coli, bacteria que también puede secretarlos, lo que permite la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se puede recuperar directamente de E. coli y ser químicamente unidos para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otro planteamiento, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente de cultivos de células huésped recombinantes. El fragmento Fab y F(ab')₂ con mayor vida media *in vivo* que comprende residuos de un epítipo de unión a un receptor de rescate se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.869.046. Los expertos en este campo conocerán otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la patente de EE.UU. n.º 5.571.894 y la patente de EE.UU. n.º 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están privados de regiones constantes; por ello, son aptos para una unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Se pueden construir proteínas de fusión sFv para obtener la fusión de una

proteína efectora en el extremo carboxi terminal o amino terminal de un sFv. Véase Antibody Engineering, editorial Borrebaeck, citado anteriormente. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

[00231] *Anticuerpos humanizados*

[00232] La presente invención engloba anticuerpos humanizados. En la materia se conocen diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que sea no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se conocen a menudo como residuos "importados", que generalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y sus colaboradores (Jones y col. (1986), Nature, 321:522-525, Riechmann y col. (1988), Nature, 332:323-327 y Verhoeyen y col. (1988), Science, 239:1534-1536), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. n.º 4.816.567) donde se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de especies no humanas. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos en que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR se sustituyen por residuos de puntos análogos de anticuerpos de roedores.

[00233] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se utilizarán en la realización de los anticuerpos humanizados es muy importante para disminuir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método del "más apto", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de un roedor se compara con toda la biblioteca conocida de secuencias de dominio variable de humanos. La secuencia humana más parecida a la del roedor se acepta entonces como estructura humana para el anticuerpo humanizado (Sims y col. (1993), J. Immunol., 151:2296 y Chothia y col. (1987), J. Mol. Biol., 196:901). Otro método utiliza una estructura específica derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo específico de cadenas ligeras o pesadas. Esta misma estructura se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 y Presta y col. (1993), J. Immunol., 151:2623).

[00234] Además, es importante que los anticuerpos se humanicen conservando una

afinidad alta al antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con uno de los métodos, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias originales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Generalmente se dispone de modelos de inmunoglobulina tridimensional conocidos por los expertos en la materia. Existen programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata. La inspección de estas visualizaciones posibilita el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de aquellos residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación para lograr la característica deseada del anticuerpo, como por ejemplo una mayor afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable influyen directamente y en mayor medida en la unión al antígeno.

[00235] *Anticuerpos humanos*

[00236] Los anticuerpos humanos anti-ALK-1 se pueden construir combinando una o más secuencias del dominio variable de clones de Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación en fagos derivados de humanos con una o más secuencias del dominio constante humanas conocidas, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos humanos monoclonales anti-ALK-1 se pueden producir por el método del hibridoma. Las líneas celulares del mieloma humano y heteromieloma humano-murino también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner y col., J. Immunol., 147: 86 (1991).

[00237] Actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, una vez inmunizados, de generar un repertorio completo de anticuerpos humanos cuando no exista producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la región del gen (JH) en ratones quiméricos y en líneas germinales de ratones mutantes ocasiona la completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de la inmunoglobulina de la línea germinal humana en la línea germinal de dicho ratón mutante ocasionará la producción de anticuerpos humanos frente al antígeno presentado. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362: 255 (1993);

Bruggermann y col., Year in Immunol., 7: 33 (1993).

[00238] También se puede utilizar la transposición de genes para derivar anticuerpos humanos de otros no humanos, por ejemplo, de roedores, en que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de inicio. Según este método, que también se denomina "impronta de epítomos", la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de presentación en fagos como las descritas anteriormente se sustituyen por un repertorio de genes de dominio V humanos, lo que crea una población de quimeras Fab o scFv de cadena humana/no humana. La selección con el antígeno da lugar al aislamiento de un Fab o scFV quimérico de cadena humana/no humana, en que la cadena humana restaura el sitio de unión al antígeno destruido al eliminar la cadena no humana correspondiente del clon primario de la presentación en fagos, es decir, el epítipo rige (sella) la elección de la molécula de la cadena humana. Cuando el proceso se repite para sustituir la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos que no tienen residuos de la FR o CDR de origen no humano.

[00239] *Anticuerpos biespecíficos*

[00240] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión a al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión corresponde a ALK-1 y la otra a cualquier otro antígeno. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítomos diferentes de la proteína de ALK-1. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos de las células que expresan el ALK-1. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al ALK-1 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide de la vinca, cadena A de ricino, metotrexato o hapteno con un isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

[00241] Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la materia. La producción recombinante tradicional de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen distintas especificidades (Milstein y Cuello, Nature, 305: 537 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación

de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante complicada, y la cantidad de producto que se obtiene es baja. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker y col., EMBO J., 10: 3655 (1991).

[00242] Según un planteamiento distinto y más preferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a las secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, de la ligera, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan conjuntamente a un organismo anfitrión adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipéptidos en realizaciones en las que las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación de dos o tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en índices iguales da como resultado producciones elevadas o los índices no tienen particular importancia.

[00243] En una realización preferente de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una de las mitades de la molécula biespecífica proporciona un método de fácil separación. Este método se desveló en el documento WO 94/04690. Para obtener más información sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, consúltese, por ejemplo, Suresh y col., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

[00244] Según otro enfoque, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos se puede modificar mediante ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo de células recombinantes. La interfaz preferente comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante del anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales cortas de aminoácidos de la interfaz de la

primera molécula del anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) larga(s) se crean en la interfaz de la segunda molécula del anticuerpo al reemplazar las cadenas laterales largas de aminoácidos por cadenas más cortas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre los productos finales no deseados, tales como los homodímeros.

[00245] Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado se puede acoplar con avidina, el otro con biotina. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para conseguir que las células del sistema inmunitario actúen sobre células no deseadas (patente de EE.UU. n° 4.676.980) y el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360 y WO 92/00373 y la patente europea EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden obtener utilizando cualquier método de enlace cruzado adecuado. Los agentes reticulantes adecuados se conocen bien en la materia y se desvelan en la patente de EE.UU. n° 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

[00246] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descritos en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar utilizando una unión química. Brennan y col., Science, 229: 81 (1985) se describe un procedimiento mediante el cual los anticuerpos intactos se escinden por vía proteolítica para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia de arsenito de sodio del agente que forma complejos con el ditiol para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados del tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados del Fab'-TNB posteriormente se reconvierte en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de otro derivado del Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[00247] Los recientes progresos han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de E. coli, que se pueden emparejar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífica F(ab')₂ completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de E. coli y se sometió a un emparejamiento químico dirigido in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor HER2 y las células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de los

linfocitos citotóxicos humanos contra objetivos de tumor de mama humano.

[00248] También se han descrito varias técnicas para realizar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny y col., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se oxidaron de nuevo para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para producir los homodímeros del anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento tienen que aparearse con los dominios complementarios VL y VH de otro fragmento, formando, por lo tanto, dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena única (sFv). Consultar Gruber y col., J. Immunol., 152:5368 (1994).

[00249] Se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt y col. J. Immunol. 147: 60 (1991).

[00250] *Anticuerpos multivalentes*

[00251] Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) con mayor rapidez que un anticuerpo bivalente por una célula que exprese un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son los que no pertenecen a la clase IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante la expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión al antígeno. El dominio preferente de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En esta situación, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión al antígeno amino-terminal a la región Fe. El anticuerpo multivalente preferente en la presente memoria descriptiva comprende (o consiste en) entre tres y ocho, aunque preferentemente cuatro, sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente contiene al menos una cadena de polipéptidos (y preferentemente dos), comprendiendo ésta(s) dos o más dominios

variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos puede(n) comprender VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptidos de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos puede(n) comprender: una cadena VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-región Fc o una cadena VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva preferentemente comprende también al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva, por ejemplo, puede comprender entre dos y ocho polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera considerados en esta memoria descriptiva comprenden un dominio variable de la cadena ligera y, opcionalmente, un dominio CL.

[00252] *Variantes de anticuerpos*

[00253] En algunas formas de realización se contempla la modificación o modificaciones de la secuencia de aminoácidos descritas en la presente memoria. Por ejemplo, puede desearse mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios nucleótidos adecuados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis del péptido. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones aminoacídicas pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del sujeto en el momento que ésta se prepare.

[00254] Un método útil para la identificación de determinados residuos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina", tal como se describe en Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En la presente memoria descriptiva, se identifica un residuo o grupo de residuos dianas (por ejemplo, residuos cargados como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido con carga negativa o neutra (preferentemente, alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Estas localizaciones de los aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan al introducir más u otras variantes en los sitios de sustitución. Por lo tanto, a pesar de que el sitio donde se introducirá una variación de una secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación per se tenga un carácter predeterminado. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un

sitio determinado, se realiza un proceso de barrido de alanina o mutagénesis aleatoria en el codón o la región objetivo, y las inmunoglobulinas expresadas se examinan para detectar la actividad deseada.

[00255] Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones en los extremos amino o carboxi terminal que varían en longitud desde un simple residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones dentro de la secuencia de uno o múltiples residuos de aminoácidos. Algunos ejemplos de inserciones en los extremos terminales son un anticuerpo con un residuo metionil en el extremo N terminal o un anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumente la vida media sérica del anticuerpo.

[00256] La glicosilación de los polipéptidos se realiza generalmente por enlace tipo N u O. El enlace N se refiere al anclaje del residuo glucídico en la cadena lateral de un residuo de asparragina. Las secuencias de tripéptidos asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento para los anclajes enzimáticos del residuo glucídico a la cadena lateral de asparragina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La O-glicosilación consiste en la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[00257] La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra fácilmente alterando la secuencia de aminoácidos para que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación por enlace N). La alteración también se puede realizar mediante la adición o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación por enlace O).

[00258] Cuando el anticuerpo comprenda una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido al mismo. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidratos madura que carezca de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de EE.UU. n° 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también la solicitud de patente de EE.UU. n° 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectriz en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo se describen en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet y col., y la patente de EE.UU. n° 6.602.684, Umana y col. Los anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se

describen en el documento WO 1997/30087, Patel y col. Véanse también los documentos WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) concernientes a los anticuerpos con un carbohidrato alterado unidos a la región Fc del mismo. Véase también la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2005/0123546 (Umana y col.) sobre moléculas de unión al antígeno con glicosilación modificada.

[00259] En la presente memoria descriptiva, la variante de glicosilación preferente comprende una región Fc, en que una estructura de carbohidratos anexa a la región Fc carece de fucosa. Estas variantes han mejorado la función de la ADCC. Opcionalmente, la región Fc también comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la zona que mejora aún más la ADCC; por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos). Entre las publicaciones relacionadas con los anticuerpos "defucosilados" o "con déficit de fucosa" podríamos citar: La patente de EE.UU. n.º 2003/0157108; el documento WO 2000/61739; el documento WO 2001/29246; las patentes de EE.UU. n.º 2003/0115614; 2002/0164328; 2004/0093621; 2004/0132140; 2004/0110704; 2004/0110282; 2004/0109865; los documentos WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki y col., J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki y col., Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Entre los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos defucosilados encontraríamos las células Lec13 CHO con déficit de fucosilación de proteínas (Ripka y col., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); la Solicitud de Patente de EE.UU. n.º 2003/0157108 A1, Presta, L y el documento WO 2004/056312 A1, Adams y col., especialmente el ejemplo 11) y las líneas celulares con eliminación de un gen, como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8 y células CHO con eliminación de un gen (Yamane-Ohnuki y col., Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

[00260] Otra clase de variante es una variante de sustitución aminoacídica. Estas variantes reemplazan al menos un residuo de aminoácidos en la molécula del anticuerpo por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero las alteraciones de la FR también se contemplan. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 2 en el encabezado "sustituciones preferentes". Si dichas sustituciones ocasionan un cambio en la actividad biológica, entonces los productos se pueden examinar y se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 2, o como se describe con mayor detalle más adelante con referencia a las clases de aminoácidos.

Tabla 2

Residuo Original	Substituciones Ejemplares	Substituciones Preferentes
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val, Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucina	Leu

[00261] Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la base del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación plana o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el lugar diana, o (c) el residuo de la cadena lateral. Los residuos producidos naturalmente se dividen en grupos en función de propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: his, lys, arg;

(5) residuos que tiene influencia en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

[00262] Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

[00263] Una clase de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Por lo general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para profundizar en su desarrollo tendrá(n) propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental desde el cual se generó (generaron). Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución involucra la maduración de afinidad utilizando una presentación en fagos. De manera resumida, varios sitios de regiones hipervariables (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones posibles de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de esta manera se presentan a partir de partículas filamentosas de fagos como fusiones con el producto del gen III de M13 que hay dentro de cada partícula. Las variantes representadas en fagos se examinan entonces para detectar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se desvela en la presente memoria descriptiva. Para identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar mutagénesis mediante barridos de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes son candidatos a la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente memoria descriptiva. Una vez generadas estas variantes, el panel de variantes está sujeto a examen como se describe en la presente memoria descriptiva y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes se pueden seleccionar para desarrollo posterior.

[00264] Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante varios métodos conocidos en el sector. Estos métodos incluyen, entre otros, aislamiento desde una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos presentes en la naturaleza) o preparación mediante mutagénesis con mediación oligonucleótida (o dirigida al sitio), mutagénesis mediante PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

[00265] Puede ser deseable introducir una o más modificaciones en los aminoácidos

85

en la región Fc de polipéptidos de inmunoglobulina, lo que genera una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄ humanas) que contenga una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos, incluida la de la cisteína bisagra.

[00266] Según esta descripción y los conocimientos del sector, se contempla que en algunas formas de realización un anticuerpo utilizado en los métodos pueda comprender una o más alteraciones, frente a su anticuerpo homólogo de tipo natural, por ejemplo, en la región Fc. No obstante, estos anticuerpos conservarían sustancialmente las mismas características necesarias para un uso terapéutico, en comparación con sus homólogos de clase natural. Por ejemplo, se cree que se pueden realizar algunas alteraciones en la región Fc que daría como resultado la unión C1q alterada y/o en Citotoxicidad Dependiente de Complementos (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); Patente de EE.UU. n.º 5.648.260; Patente de EE.UU. n.º 5.624.821; y el documento WO94/29351 que tratan otros ejemplos de variantes de regiones Fc. Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpos con capacidad de unión a los FcR mejorada o disminuida. El contenido de estas publicaciones de patentes se incorpora específicamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Shields y col., J. Biol. Chem., 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con un aumento de su vida media y una unión mejorada al receptor neonatal Fc (FcRn), que es responsable de la transmisión de las IgG maternas al feto (Guyer y col., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim y col., J. Immunol. 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton y col.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la zona que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Las variantes polipeptídicas con secuencias aminoacídicas de la región Fc alteradas y capacidad aumentada o disminuida de unión a Cq1 se describen en la Patente de EE.UU. n.º 6.194.551B1 y en el documento WO99/51642. El contenido de dichas publicaciones de patentes se incorpora específicamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Idusogie y col. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

[00267] *Derivados de anticuerpos*

[00268] Los anticuerpos pueden modificarse aún más para que contengan fracciones no proteináceas adicionales que son conocidas en el sector y se encuentran disponibles. Preferentemente, las porciones adecuadas para la derivación del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de los polímeros solubles en agua incluyen los siguientes componentes: polietilenglicol (PEG), copolímero de etilenglicol / propilenglicol,

carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinilo, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero anhídrido etileno/maleico, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propopilenglicol, óxido de prolipropileno / copolímeros de óxido de etileno, polialcoholes polioxietilados (por ejemplo glicerol), alcohol polivinilo, y mezclas de los mismos. Es posible que el polietilenglicol propionaldehído ofrezca ventajas en la elaboración, dada su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y estar ramificado o no. La cantidad de polímeros adheridos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, los polímeros pueden ser las mismas o diferentes moléculas. Generalmente, la cantidad y/o clase de polímeros utilizada para la derivación puede determinarse en función de ciertas consideraciones, como, aunque sin limitarse a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el anticuerpo derivado se utilizará en una terapia en condiciones definidas, etc.

[00269] *Detección de anticuerpos con las propiedades deseadas*

[00270] Los anticuerpos se pueden caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y sus funciones biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la materia. En algunas formas de realización, los anticuerpos se caracterizan por una o más de las siguientes características: unión al ALK-1, reducción o bloqueo de la activación del receptor ALK-1, reducción o bloqueo de la cascada de señalización molecular del receptor de ALK-1 (por ejemplo, la fosforilación de Smad1, Smad5 y/o Samd8), la alteración o el bloqueo del ligando del ALK-1 al ALK-1 (por ejemplo, BMP9 o BMP10), inhibición de la angiogénesis, inhibición de la linfangiogénesis, el tratamiento y/o la prevención de un tumor, trastorno de proliferación celular o un cáncer, o la prevención de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad del ALK-1.

[00271] Los anticuerpos purificados se pueden caracterizar aún más mediante una serie de ensayos que incluyen, aunque sin limitarse a, la secuenciación del extremo N terminal, el análisis de aminoácidos, la cromatografía líquida de alta resolución no desnaturalizante de exclusión por tamaño (HPLC), la espectrometría de masas, la cromatografía de intercambio iónico y la digestión con papaína.

[00272] En ciertas formas de realización de la invención se analiza la actividad biológica de los anticuerpos producidos en la misma. En algunas formas de realización, se prueba la actividad de unión al antígeno de los anticuerpos de la presente invención. Los ensayos de unión al antígeno que se conocen en la especialidad y pueden ser usados en la presente memoria descriptiva incluyen ensayos de unión competitiva o directa que usan

técnicas como western blots, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática), inmunoanálisis de doble anticuerpo (tipo "sandwich"), ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A.

[00273] En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo alterado que tiene parte, pero no la totalidad, de las funciones efectoras, lo que le convierte en un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la vida media del anticuerpo *in vivo* es importante, pero determinadas funciones efectoras (como complemento y ADCC) son innecesarias o dañinas. En ciertas formas de realización, las actividades en la Fc de la inmunoglobulina producida se miden para garantizar que sólo se mantengan las propiedades deseadas. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* o *in vivo* para confirmar la reducción/depleción de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión del receptor Fc (FcR) pueden realizarse para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por eso es probable que carezca de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, expresan sólo Fc(RIII), mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII). La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). En las patentes de EE.UU. n.º 5.500.362 ó 5.821.337 se describe un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se encuentran las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) y las células asesinas (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el que se detalla en Clynes y col., *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo los ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse al C1q y por ello carece de actividad CDC. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede efectuar un ensayo de CDC, como, por ejemplo, el que se describe en Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996). También se pueden realizar la unión de FcRn y eliminación *in vivo*/determinaciones de vida media con el uso de métodos conocidos en este ámbito; por ejemplo, los descritos en la sección Ejemplos.

[00274] *Vectores, células huésped y métodos recombinantes*

[00275] Para la producción recombinante de un anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para seguir clonándose (amplificación del ADN) o expresarse. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleótidas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras

del anticuerpo). Existen muchos vectores disponibles. La elección del vector depende en parte de la célula anfitrión que se utilice. Por lo general, las células huésped preferentes son de origen procariótico o eucariótico (habitualmente, de mamíferos). Se tendrá en cuenta que las regiones constantes de cualquier isótopo se pueden utilizar para este fin, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y obtener de cualquier humano o especie animal.

[00276] *Generación de anticuerpos usando células huésped eucarióticas:*

[00277] *Construcción de vectores*

[00278] Las secuencias de polinucleótidos que codifiquen componentes polipeptídicos del anticuerpo se pueden obtener utilizando técnicas recombinantes estándar. Las secuencias deseadas de polinucleótidos se pueden aislar y secuenciar a partir de anticuerpos que producen células, como por ejemplo células de hibridoma.

Alternativamente, los polinucleótidos se pueden sintetizar usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en los anfitriones procarióticos. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la materia se pueden utilizar para el propósito de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se van a insertar en el vector y la célula anfitrión concreta que se transformará con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de un polinucleótido heterólogo, o ambas) y compatibilidad con la célula anfitrión concreta donde resida. Por lo general, los componentes del vector incluyen, entre otros: un origen de replicación, un gen marcador de la selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia de señal, la inserción del ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

[00279] En general, los vectores plásmidos con secuencias de control y replicón que se derivan de especies compatibles con la célula anfitrión se usan en conexión con estos anfitriones. Por lo general, el vector porta un sitio de replicación, así como secuencias de marcado, capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma habitualmente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie *E. coli*. El pBR322 contiene genes que codifican la resistencia a la ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, de este modo, proporcionan una forma fácil de identificar células transformadas. El pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos pueden contener también, o ser modificados para que contengan, promotores que pueden ser utilizados por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. En la patente de EE.UU. n° 5.648.237, Carter y col., se describen en detalle

ejemplos de derivados del pBR322 usados para la expresión de anticuerpos concretos.

[00280] Además, los vectores fágicos que contienen secuencias de control y replicón compatibles con los microorganismos anfitrión se pueden usar como vectores de transformación con relación a estos anfitriones. Por ejemplo, un bacteriófago como λ GEM™-11 se puede utilizar para marcar un vector recombinante que se pueda utilizar para transformar células huésped susceptibles como E. coli LE392.

[00281] El vector de expresión puede comprender dos o más pares de promotores de cistrón, que codifiquen cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida situada antes de su extremo 5' en un cistrón que modula su expresión. Los promotores procarióticos suelen pertenecer a dos clases: inducibles y constitutivos. Un promotor inducible es aquél que inicia un aumento de los niveles de transcripción del cistrón bajo su control como respuesta a cambios en las condiciones del cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

[00282] Se conoce una gran cantidad de promotores que diversas células huésped potenciales reconocen. El promotor seleccionado puede enlazarse de forma funcional al ADN del cistrón que codifica la cadena pesada o ligera eliminando el promotor en el ADN de origen a través de una digestión enzimática mediante restricción e introduciendo la secuencia aislada del promotor en el vector. Tanto la secuencia nativa del promotor como muchos promotores heterólogos se pueden utilizar para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes objetivo. En algunas formas de realización, se utilizan promotores heterólogos, puesto que por lo general permiten una mayor transcripción y producción del gen objetivo expresado, en comparación con el promotor polipeptídico objetivo nativo.

[00283] Los promotores aptos para su uso con huéspedes procarióticos incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de lactosa y β -galactamasa, un sistema promotor a base de triptofano (trp) y promotores híbridos como el promotor tac o el trc. Sin embargo, también son aptos otros promotores que son funcionales en bacterias (como otros promotores fágicos o bacterianos conocidos). Se han publicado sus secuencias de nucleótidos, lo que permite que un experto pueda ligarlas de manera operable a cistrones que codifiquen las cadenas pesada y ligera objetivo (Siebenlist y col. (1980) Cell 20: 269) usando enlazadores o adaptadores que proporcionen sitios de restricción necesarios.

[00284] En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de la secuencia de señal de la secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados en una membrana. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector o una parte del ADN del polipéptido objetivo que se inserta en el vector. La secuencia de señal seleccionada para los propósitos de esta

invención debería ser aquella que la célula anfitrión reconozca y procese (es decir, que una peptidasa de señal escinda). En las células huésped procarióticas que no reconocen ni procesan las secuencias de señal nativas para los polipéptidos heterólogos, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, entre el grupo formado por fosfatasa alcalina, penicilasa, lpp o líderes de enterotoxina II termoestable (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una forma de realización de la invención, las secuencias de señal usadas en los dos cistrones del sistema de expresión son secuencias de señal STII o variantes de ellas.

[00285] En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la invención puede tener lugar en el citoplasma de la célula anfitrión y, por tanto, no requiere la presencia de secuencias de señal de secreción dentro de cada cistron. A este respecto, las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina se expresan, multiplican y ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Determinadas cepas de huéspedes (por ejemplo, las cepas de *E. coli* trxB-) ofrecen condiciones citoplasmáticas que son favorables a la formación de uniones de disulfidos, lo que permite una multiplicación y ensamblaje correctos de las subunidades de las proteínas expresadas. Proba y Pluckthun, *Gene*, 159:203 (1995).

[00286] Las células huésped procarióticas aptas para la expresión de anticuerpos incluyen las clases Archaeobacteria y Eubacteria, como los microorganismos grampositivos o gramnegativos. Entre los ejemplos de bacterias útiles se incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, las especies *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una forma de realización, se utilizan células gramnegativas. En una forma de realización, se utilizan células de *E. coli* como anfitriones para la invención. Entre los ejemplos de cepas *E. coli* se incluyen la cepa W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), págs. 1190-1219; n.º en depósito en ATCC 27.325) y derivados de las mismas, que incluyen la cepa 33D3 con el genotipo W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT(Δ nmpc-fepE) degP41 kanR (Patente de EE.UU. n.º. 5.639.635). Otras cepas y derivados de las mismas, como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también están indicados. Estos ejemplos tienen carácter ilustrativo y no limitador. Los métodos para construcción de derivados de cualquiera de las bacterias antes mencionadas con genotipos definidos son conocidos en el sector y se describen, por ejemplo, en Bass y col., *Proteins*, 8:309-314 (1990). Por lo general, es necesario seleccionar las bacterias

apropiadas teniendo en cuenta la capacidad de replicación del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, las especies *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* se pueden usar adecuadamente como anfitrión cuando se utilicen plásmidos bien conocidos como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para proporcionar el replicón. Normalmente, en caso de que la célula huésped deba secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas puede resultar conveniente incorporar al cultivo celular inhibidores adicionales de la proteasa.

[00287] *Producción de anticuerpos*

[00288] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados como sea adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[00289] Transformación significa introducir ADN en el anfitrión procariótico de forma que el ADN sea replicable, bien como elemento extracromosómico o integrante cromosómico. Según la célula anfitrión que se utilice, la transformación se realiza empleando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio se usa por lo general para células bacterianas que contienen barreras sustanciales en la pared celular. En otro método de transformación se emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica utilizada es la electroporación.

[00290] Las células procarióticas usadas para producir los polipéptidos se cultivan en medios conocidos en la materia y aptos para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Un ejemplo de medio apropiado es el caldo de Luria (LB) más nutrientes suplementarios necesarios. En algunas formas de realización, los medios también contienen un agente de selección, elegido en función de la construcción del vector de expresión, para permitir el crecimiento selectivo de células procarióticas que contengan el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios de cultivo para el crecimiento de células que expresen un gen resistente a ampicilina.

[00291] Cualquier suplemento necesario aparte de carbono, nitrógeno y fuentes inorgánicas de fosfato también se puede incluir a concentraciones apropiadas, introduciéndolo solo o como mezcla con otro suplemento o medio de cultivo, como una fuente compleja de nitrógeno. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados en el grupo formado por glutatona, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotretitol.

[00292] Las células huésped procarióticas se cultivan a temperaturas apropiadas. El crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, se produce a un rango de temperaturas comprendido entre unos 20 °C a unos 39 °C; mejor aún, entre unos 25 °C a unos 37 °C; y, aún mejor, a unos 30 °C. El pH del medio de cultivo puede ser cualquiera comprendido entre 5 y 9

aproximadamente, dependiendo sobre todo del microorganismo huésped. El pH para *E. coli* oscila, preferiblemente entre 6,8 y 7,4 aproximadamente, y mejor aún si es de 7,0.

[00293] Si en el vector de expresión se utiliza un promotor inducible, la expresión de la proteína se induce en condiciones aptas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores PhoA se utilizan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Según esto, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitador de fosfato para conseguir la inducción. Preferiblemente, el medio de cultivo limitador de fosfato es el C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons y col., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Se pueden utilizar otros inductores diversos, según el constructo de vector empleado, como se sabe en la materia.

[00294] En una forma de realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en el periplasma de las células huésped y de allí se recuperan. La recuperación de las proteínas supone habitualmente la alteración del microorganismo, por lo general mediante choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez producida la alteración de las células, los desechos celulares o células enteras se pueden eliminar mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse aún más, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad con resina. De manera alternativa, se pueden transportar proteínas dentro del medio de cultivo y aislarlas en él. Las células pueden retirarse del cultivo, y el sobrenadante del cultivo puede filtrarse y concentrarse para proceder a una posterior purificación de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden volver a aislarse e identificarse mediante métodos comúnmente conocidos, como la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y el ensayo "Western blot".

[00295] En uno de los aspectos de la invención, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad mediante proceso de fermentación. Existen varios procesos disponibles de fermentación de lotes alimentados a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala se realizan en dispositivos de al menos 1000 litros de capacidad, preferiblemente entre aprox. 1.000 y 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan agitadores de hélice para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente preferente de carbono/energía). La fermentación a pequeña escala hace referencia generalmente a la fermentación en fermentadores de aproximadamente no más de 100 litros de capacidad volumétrica, que pueden variar entre de 1 y 100 litros aproximadamente.

[00296] En un proceso de fermentación, la inducción de expresión proteica se inicia típicamente después de que las células hayan crecido en condiciones adecuadas hasta alcanzar la densidad deseada, por ejemplo una OD550 de entre 180-220, momento en el

cual las células se encuentran en la fase estacionaria temprana. Pueden usarse distintos inductores, de acuerdo con el constructo del vector utilizado, tal y como se conoce en la materia y como se ha descrito anteriormente. Las células pueden hacerse crecer durante períodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen normalmente durante entre unas 12 y 50 horas, aunque es posible utilizar tiempos de inducción más prolongados o más cortos.

[00297] A fin de mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos, pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento adecuados de los polipéptidos de los anticuerpos secretados, pueden utilizarse vectores adicionales que sobreexpresen las proteínas chaperonas, como las proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilpropil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) para transformar conjuntamente las células huésped procarióticas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan la solubilidad y el plegamiento adecuados de las proteínas heterólogas producidas en células bacterianas huésped. Chen y col. (1999) J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou y col., patente de EE.UU. n.º 6.083.715; Georgiou y col., patente de EE.UU. n.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie y col. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

[00298] Pueden utilizarse ciertas cepas huésped con deficiencia de enzimas proteolíticas para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas (especialmente las que son sensibles desde el punto de vista proteolítico) para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de células huésped pueden modificarse para efectuar mutaciones genéticas relativas a los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, como la Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de éstas. Algunas cepas de E. coli con deficiencia de proteasas están disponibles y se describen, por ejemplo, en Joly y col. (1998), citado anteriormente, las patentes de EE.UU. n.º 5.264.365 y 5.508.192 (Georgiou y col.) y Hara y col., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

[00299] En una forma de realización, se utilizan cepas de E. coli con deficiencia de enzimas proteolíticas transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas como células huésped en el sistema de expresión.

[00300] *Purificación de anticuerpos*

[00301] Pueden emplearse métodos estándar de purificación de proteínas conocidos en la materia. Los siguientes procedimientos tienen un carácter ejemplar en lo que se refiere a los procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de

intercambio iónico o de inmutaofinidat, precipitaci3n en etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia en anhídrido silícico o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatoisoeñoque, SDS-PAGE, precipitaci3n en sulfato de amonio y filtrado en gel mediante, por ejemplo, Sephadex G-75.

[00302] En un aspecto, se utiliza Proteína A inmutilizada en una fase s3lida para la purificaci3n por inmutaofinidat de los productos de anticuerpos de longitud completa. La proteína A es una proteína de pared celular de 41kD del Staphylococcus aureas que se une con gran afinidat a la regi3n Fc de los anticuerpos. Lindmark y col. (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. La fase s3lida a la que se fija la Proteína A es preferiblemente una columna que contenga una superficie de vidrio o de sílice, o, a3n mejor, una columna de ácido silícico o de vidrio poroso controlado. En algunas aplicaciones, la columna se ha revestido con un reactivo, como el glicerol, para intentar evitar la adherencia no específica de contaminantes.

[00303] Como primer paso de purificaci3n, la preparaci3n derivada del cultivo celular, seg3n lo descrito anteriormente, se aplica a la fase s3lida de la Proteína A inmutilizada para permitir la uni3n específica del anticuerpo de inter3s a la Proteína A. A continuaci3n, se procede a lavar la fase s3lida para eliminar los contaminantes que se le hayan unido de forma no específica. Por 3ltimo, el anticuerpo de inter3s se recupera de la fase s3lida mediante eluci3n.

[00304] *Generaci3n de anticuerpos usando células hu3sped eucari3ticas:*

[00305] Los componentes del vector suelen incluir, entre otros, aunque sin limitarse a, uno o m3s de los elementos siguientes: una secuencia de seál, un origen de replicaci3n, uno o m3s genes marcadores, un potenciador, un promotor y una secuencia de finalizaci3n de la transcripci3n.

[00306] *Componente de secuencia de la seál*

[00307] Un vector para uso en una célula anfitri3n eucari3tica puede contener tambi3n una secuencia de seál u otro polip3ptido con una escisi3n específica en el extremo N terminal de la proteína o el polip3ptido maduro de inter3s. La secuencia de seál heter3loga seleccionada es preferentemente aqu3lla que la célula anfitri3n reconoce y procesa (es decir, que una peptidasa de seál escinde). En la expresi3n celular de los mamíferos, est3n disponibles las secuencias de seál de los mamíferos as3 como los líderes secretores virales, por ejemplo, la seál del herpes simplex gD.

[00308] El ADN para la regi3n de dicho precursor est3 ligado en la estructura de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

[00309] *Origen de la replicaci3n*

[00310] Por lo general, no es necesario un componente de origen de la replicaci3n

para los vectores de expresión en mamíferos. Por ejemplo, el origen de SV40 se puede utilizar habitualmente sólo porque contiene el promotor temprano.

[00311] *Gen componente de selección*

[00312] Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) otorgan resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, donde proceda o (c) proporcionan nutrientes básicos no disponibles a partir de medios complejos.

[00313] En un ejemplo de un esquema de selección se utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula anfitrión. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que otorga resistencia al fármaco y, así, sobreviven al régimen de selección. En ejemplos de esta selección dominante se utilizan fármacos como neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

[00314] Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de las células encargadas de absorber el ácido nucleico del anticuerpo, como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína I y II (preferentemente genes de metalotioneína de primates), adenosina deaminasa, ornitina decarboxilasa, etc.

[00315] Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contenga metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo del DHFR. Una célula anfitrión adecuada cuando se utiliza el DHFR de clase natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad del DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

[00316] Alternativamente, las células huésped (en especial los anfitriones de clase natural que contienen DHFR endógeno) transformadas o transformadas conjuntamente con secuencias de ADN que codifiquen un anticuerpo, la proteína DHFR de clase natural y otro marcador seleccionable como la aminoglicosida 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse mediante crecimiento celular en un medio que contenga un agente de selección para el marcador seleccionable, como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, canamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE.UU. n.º 4.965.199.

[00317] *Componente promotor*

[00318] Los vectores de expresión y clonación suelen contener un promotor enlazado de forma funcional al ácido nucleico del polipéptido del anticuerpo que el organismo anfitrión reconoce. Se conoce la existencia de secuencias de promotores para eucariotas. Los genes prácticamente aleucarióticos tienen una región rica en AT situada

aproximadamente a entre 25 y 30 bases antes del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra a entre 70 y 80 bases antes del inicio de la transcripción de muchos genes es la región CNCAAT, en que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para añadir la cola de poli(A) al extremo 3' de la secuencia de codificación. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en los vectores de expresión eucariótica.

[00319] La transcripción de polipéptidos de anticuerpos a partir de los vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus como el poliomavirus, el virus de la viruela de las aves de corral, el adenovirus (como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviario, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus 40 de los simios (SV40), promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, o promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células huésped.

[00320] Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen fácilmente como un fragmento de restricción del SV40, que también contiene el origen viral de replicación del SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene fácilmente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para la expresión del ADN en huéspedes mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como vector se da a conocer en la patente de EE.UU. n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.601.978. Alternativamente, la repetición del terminal largo del virus del sarcoma de Rous se puede utilizar como promotor.

[00321] *Componente elemento potenciador*

[00322] La transcripción del ADN que codifica el polipéptido del anticuerpo de esta invención a través de eucariotas superiores se aumenta con frecuencia al insertar la secuencia de un potenciador en el vector. Se conocen ya muchas secuencias de potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). No obstante, lo habitual es que se utilice un potenciador procedente de un virus de células eucarióticas. Algunos ejemplos incluyen el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de la replicación (bp 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de la replicación y los potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) para elementos de potenciación para la activación de los promotores eucarióticos. El potenciador puede empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia de

codificación del polipéptido del anticuerpo, pero preferentemente se encuentra en un sitio 5' desde el promotor.

[00323] *Componente de finalización de la transcripción*

[00324] Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucarióticas contendrán también, por lo general, secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y la estabilización del ARNm. Estas secuencias están habitualmente disponibles desde las regiones no traducidas del extremo 5' y, ocasionalmente, el 3' de los ADN o ADNc virales o eucarióticos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión que se da a conocer en el mismo.

[00325] *Selección y transformación de células huésped*

[00326] Entre las células huésped apropiadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente memoria descriptiva figuran las células eucariotas superiores descritas en la presente memoria descriptiva, incluyendo células huésped de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento habitual. Ejemplos de líneas celulares útiles de mamíferos son la línea CV1 de riñón del mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 ó células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de crías de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células caninas de riñón (MDCK, ATCC CCL 34); células de riñón de ratas búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células humanas de pulmón (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[00327] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados como sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[00328] *Cultivo de células huésped*

[00329] Las células huésped utilizadas para producir un anticuerpo de esta invención se pueden cultivar en diversos medios. Medios comercialmente disponibles como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) son aptos para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem.102:255 (1980), Patentes de Estados Unidos núms. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; ó 5.122.469; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; o la patente de Estados Unidos Re. 30.985 se pueden utilizar como medios de cultivo para células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar cuando sea necesario con hormonas y otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos de traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes por lo habitual en las concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario, a concentraciones adecuadas, que los expertos en la materia conociesen. Las condiciones del cultivo, como la temperatura o el pH entre otras, son las utilizadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para expresión y serán evidentes para el experto en la materia.

[00330] *Purificación del anticuerpo*

[00331] Al utilizar técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir a escala intracelular o directamente secretado en el medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como primer paso, los desechos de partículas, ya sean células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran primero, por lo general, utilizando un filtro para concentración de proteínas comercializado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. En cualquiera de las fases anteriores se puede incluir un inhibidor de la proteasa como PMSF para inhibir la proteólisis y antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes espontáneos.

[00332] La composición del anticuerpo preparado a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo esta última la técnica de purificación preferente. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de las especies y del isotipo de cualquier dominio Fc de la inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo.

05 y Thorpe, (1985), "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, A. Pinchera y col., editores, páginas 475-506). Por tanto, se busca la eficacia máxima con la mínima toxicidad. Tanto los anticuerpos monoclonales como los policlonales se han descrito como útiles en estas estrategias (Rowland y col., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). Los fármacos empleados en estos métodos incluyen a la daunomicina, la doxorubicina, el metotrexato y la vindesina (Rowland y col., (1986) mencionado anteriormente). Entre las toxinas empleadas en los conjugados de anticuerpos con toxinas se encuentran toxinas bacterianas como la toxina de la difteria, toxinas vegetales como la ricina, toxinas de molécula pequeña como la geldanamicina (Mandler y col., (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler y col., (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler y col., (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu y col., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode y col. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman y col., (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas pueden producir sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión de tubulina, la unión de ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o ligandos receptores de proteínas.

[00337] El ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un anticuerpo conjugado con un radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de los linfocitos B cancerosos y normales, y contra el radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido por un quelante enlazador de tiourea (Wiseman y col., (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman y col., (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig y col., (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig y col., (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). A pesar de que el ZEVALIN actúa contra las células B del linfoma no Hodgkin (LNH), su administración ocasiona citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (Gentuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un anticuerpo conjugado con fármaco compuesto de un anticuerpo hu CD33 enlazado a calicheamicina, se aprobó en el año 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda por inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7): 686; Patentes de EE.UU. núms. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Inmugen, Inc.), un conjugado de anticuerpo con fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 enlazado al grupo de fármacos de los maitansinoides, DM1, por medio de un enlazador de disulfuro SPP, está bien avanzado en ensayos clínicos de Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan

CanAg, como los de colon, páncreas, gástricos y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de fármaco y anticuerpo compuesto de un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno anti-prostático de membrana (PSMA) unido a la fracción del fármaco maitasinoide, DM1, está en desarrollo para el tratamiento potencial de los tumores de próstata. Los péptidos auriestatinos, la auristatina E (AE) y la monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron a anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos para CD30 en tumores hematológicos) (Doronina y col., (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784) y se encuentran en desarrollo terapéutico.

[00338] Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen anteriormente en la presente memoria descriptiva. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de la *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de la *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y el tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232, publicado el 28 de octubre de 1993. Se dispone de diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos están ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden realizar utilizando una variedad de agentes de unión a proteínas bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta y col., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

[00339] También se contemplan en la presente memoria descriptiva los conjugados de un anticuerpo con una o más toxinas de molécula pequeña, como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno, CC1065 y los derivados de estas

toxinas que tengan una actividad tóxica.

[00340] *Maitansina y maitansinoides*

[00341] En algunas formas de realización, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) conjugado con una o más moléculas de maitansinoides.

[00342] Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez a partir del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. n.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producían maitansinoides, como el maitansinol y los ésteres de C-3 maitansinol (patente de EE.UU. n.º 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. No. 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663 y 4.371.533.

[00343] Los grupos de fármacos maitansinoides son grupos de fármacos que resultan atractivos para la elaboración de anticuerpos conjugados con fármacos por sus siguientes características: (i) son relativamente accesibles en lo que se refiere a su preparación mediante fermentación, modificación química o derivación de productos de fermentación, (ii) son fáciles de someter a derivación, con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de los enlazadores no disulfuro con anticuerpos, (iii) estabilidad en plasma y (iv) resultan efectivos frente a distintas líneas celulares tumorales.

[00344] Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, los métodos para elaborarlos y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 5.208.020 y 5.416.064, y en la Patente Europea n.º 0 425 235 B1, y los descubrimientos de las mismas se incorporan expresamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. En Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:8618-8623 (1996) se describen los inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 enlazado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para las células del cáncer de colon cultivadas y demostró actividad antineoplásica en ensayos de crecimiento tumoral in vivo. En Chari y col., Cancer Research, 52:127-131 (1992) se describen inmunoconjugados en que un maitansinoide se conjugó por medio de un enlazador de disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en las líneas celulares del cáncer de colon humano u otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se probó in vitro en la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie de HER-2 por célula. El conjugado

de fármaco mostró un grado de citotoxicidad similar al del fármaco de maitansinoide libre, que se pudo aumentar al aumentar la cantidad de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica baja en ratones.

[00345] Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se preparan enlazando por vía química un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin hacer que disminuya significativamente la actividad biológica de las moléculas de ambos elementos del conjugado. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5.208.020 (cuyos descubrimientos se incorporan expresamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia). Se ha demostrado que una media de 3-4 moléculas de maitansinoides conjugadas por molécula de anticuerpo resulta eficaz para mejorar la citotoxicidad de las células objetivo sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque cabría esperar que incluso una molécula de toxina/anticuerpo mejorase la citotoxicidad en comparación con el uso del anticuerpo desnudo. En la material los maitansinoides son conocidos porque se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislar de fuentes naturales. En la patente de EE.UU. n.º 5.208.020 y en otras patentes y publicaciones no patentadas a las que anteriormente se ha hecho referencia, por ejemplo, se describen maitansinoides adecuados. Los maitansinoides preferentes son el maitansinol y análogos del mismo modificados en el anillo aromático u otras posiciones de la molécula de maitansinol, como distintos ésteres del maitansinol.

[00346] Se conocen muchos grupos de enlace en la materia para producir conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los divulgados en la patente de EE.UU. n.º 5.208.020 o la patente europea 0 425 235 B1, Chari y col., Cancer Research, 52:127-131 (1992) y la solicitud de patente de EE.UU. n.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004, cuyos descubrimientos se incorporan expresamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Los conjugados anticuerpo-maitansinoide que incluyen el componente enlazador SMCC se pueden preparar de la manera que se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. n.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos enlazantes incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles al ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles a la peptidasa o grupos lábiles a la estearasa, como se revela en las patentes anteriormente identificadas, y se prefieren grupos de disulfuro y tioéter. En la presente memoria descriptiva se dan ejemplos y se describen grupos enlazadores adicionales.

[00347] Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden realizar utilizando diversos agentes de emparejamiento con proteínas bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-

maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (como glutaraldehídos), compuestos bis-azido (por ejemplo, bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de flúor (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes de unión que se prefieren sobre todo son N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson y col., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace de disulfido.

[00348] El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo de la clase de enlace. Por ejemplo, un enlace con éster se puede formar por reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas convencionales de acoplamiento. La reacción se puede producir en la posición C-3 que tenga un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tenga un grupo hidroxilo. En una forma de realización preferente, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o un análogo de éste.

[00349] *Auristatinas y dolastatinas*

[00350] En algunas formas de realización, el immunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con dolastatinas o sus análogos y derivados peptídicos, las auristatinas (patentes de EE.UU. nos. 5635483 y 5780588). Se ha demostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, la hidrólisis GTP, y la división nuclear y celular (Woyke y col. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother., 45(12):3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (patente de EE.UU. no. 5663149) y antifúngica (Pettit y col., (1998) Antimicrob. Agents Chemother., 42:2961-2965). La porción del fármaco auristatina o dolastatina puede estar unida al anticuerpo a través de los extremos terminales N (amino) ó C (carboxil) de la porción peptídica del fármaco (documento WO 02/088172).

[00351] Entre los ejemplos de formas de realización de auristatina se incluyen las porciones DE y DF enlazadas a monometilauristatina por el extremo terminal N, como se revela en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", EE.UU n.º de ser. 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004, cuyo contenido se incorpora expresamente en su totalidad a modo de referencia.

[00352] Por lo general, las porciones del fármaco basadas en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre uno o más fragmentos de aminoácidos y/o péptidos. Se pueden preparar estos enlaces peptídicos, por ejemplo, según el método de

síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, páginas 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los grupos de fármacos auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los siguientes métodos: patente de EE.UU. n.º 5635483; patente de EE.UU. n.º 5780588; Pettit y col., (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit y col., (1998) Anti-cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., y col., Synthesis, 1996, 719-725; Pettit y col., (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863. Véase también Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", EE.UU. n.º de ser. 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004, incorporados en la presente memoria descriptiva a modo de referencia en su totalidad (que revela, por ejemplo, enlazadores y métodos de preparación de compuestos de monometilvalina tales como conjugados MMAE/MMAF a enlazadores).

[00353] *Caliqueamicina*

[00354] En otras formas de realización, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina es capaz de producir la ruptura del ADN de hebra doble en concentraciones por debajo del nivel picomolar. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, véanse las patentes de EE.UU. n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296 (todas para American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de la caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen γ 1I, α 2I, α 3I, N-acetil- γ 1I, PSAG y θ 1I (Hinman y col., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode y col., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las Patentes de EE.UU. anteriormente mencionadas para American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con que es posible conjugar el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por ello, la absorción celular de estos agentes a través de la internalización mediada con anticuerpos potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

[00355] *Otros agentes citotóxicos*

[00356] Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar con los anticuerpos incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las patentes de EE.UU. nos 5.053.394 y 5.770.710, así como las esperamicinas (patente de EE.UU. n.º 5.877.296).

[00357] Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena A de difteria, los fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A

de ricina, la cadena A de abrina y la cadena A de modicina, la alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, diantina y *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), los inhibidores de *Momordica charantia*, *Sapaonaria officinalis*, curcina, y crotina, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y el tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

[00358] La presente invención también contempla un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN como por ejemplo una desoxirribonucleasa, DNasa).

[00359] Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Se dispone de diversos isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluye At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se utiliza para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para gammagrafía, por ejemplo $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , un marcador giratorio para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como diagnóstico por imágenes obtenidas mediante resonancia magnética), como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, fluorina-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[00360] Pueden incorporarse marcadores radiactivos o de otra clase al conjugado mediante formas conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores adecuados de aminoácidos que contengan, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcadores como $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} se pueden unir a través de un residuo de cisteína en el péptido. El itrio-90 se puede unir a través de un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker y col. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos detalladamente.

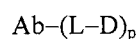
[00361] Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden realizar utilizando una variedad de agentes de unión a proteína bifuncionales como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por

ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta y col., Science, 238:1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Consúltese el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de la droga citotóxica en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil al ácido, un enlazador sensible a la peptidasa, un enlazador fotolábil o un enlazador que contenga disulfuro (Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992); Patente de EE.UU n.º 5.208.020).

[00362] Los compuestos contemplan expresamente el ADC preparado con reactivos reticulares: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (sucinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se comercializan (por ejemplo, por Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, EE.UU). Véanse las páginas 467-498 de 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

[00363] *Preparación de conjugados de anticuerpos con fármacos*

[00364] En los conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC), un anticuerpo (Ab) se conjuga con una o más porciones de un fármaco (D), por ejemplo, de 1 a 20 porciones de fármaco aproximadamente por anticuerpo, a través de un enlazador (L). Los ADC de Fórmula I se pueden preparar por varios medios, empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos, como: (1) una reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar un Ab-L, mediante un enlace covalente, seguida de la reacción con una fracción de fármaco D; y (2) una reacción de un grupo nucleófilo de una fracción de fármaco con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguida de la reacción con el grupo nucleófilo del anticuerpo. En la presente memoria descriptiva se describen métodos adicionales para la preparación del ADC.



I

[00365] El enlazador puede estar formado por uno o más componentes enlazadores. Los componentes de enlace ejemplares incluyen: 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobensiloxycarbonil ("PAB"), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC"), y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). Los componentes enlazadores adicionales son conocidos en la materia y algunos se describen en la presente memoria descriptiva. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", EE.UU. n.º

de serie 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004, cuyo contenido está incorporado íntegramente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

[00366] En ciertas formas de realización, el enlazador puede comprender residuos de aminoácidos. Los componentes enlazadores de aminoácidos ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos de aminoácidos que comprenden un componente enlazador de aminoácidos incluyen aquellos que ocurren de forma natural, tales como los aminoácidos menores y los análogos de aminoácidos que no ocurren de forma natural, como la citrulina. Los componentes enlazadores de aminoácidos pueden designarse, y optimizarse en su selectividad, para la escisión enzimática mediante una enzima específica, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, catepsina B, C y D o una proteasa plasmina.

[00367] Los grupos nucleófilos en los anticuerpos incluyen, aunque sin limitarse a ellos: (i) grupos amino terminal N, (ii) grupos amino de la cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcares donde el anticuerpo es glicosilado. Los grupos amino, tiol e hidroxilo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en las fracciones del enlazador y los reactivos del enlazador, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluro de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos. Ciertos anticuerpos contienen bisulfuros reducibles entre cadenas, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden convertirse en reactivos para conjugarse con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor como el DTT (ditiotreitól). Por tanto, cada puente de cisteína formará, en teoría, dos nucleófilos tiol reactivos. Los grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en los anticuerpos a través de la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), lo que da lugar a la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o un fragmento del mismo) mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprendan uno o más residuos de aminoácidos de cisteínas no nativas).

[00368] Los conjugados de anticuerpos con fármacos también pueden producirse mediante la modificación del anticuerpo para introducir porciones electrófilas, las cuales pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo o fármaco enlazador. Los azúcares de los anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de periodato, a fin de formar grupos cetonas o aldehídos, los cuales pueden

reaccionar con el grupo amina de los reactivos enlazadores o las porciones del fármaco. Los grupos resultantes de amina base de Schiff pueden formar un enlace estable, o se pueden reducir, por ejemplo mediante los reactivos de hidruro de boro para formar enlaces amino estables. En una forma de realización, la reacción de la porción carbohidratada de un anticuerpo glicosilado, ya sea con galactosa oxidasa o con metaperiodato de sodio, puede producir grupos de carbonilo (aldehídos y cetonas) en la proteína que pueden reaccionar con los grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra forma de realización, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina N-terminal pueden reaccionar con metaperiodato de sodio, lo que da lugar a la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; patente de EE.UU. n° 5362852). Se puede hacer que este aldehído reaccione con una porción del fármaco o un nucleófilo enlazador.

[00369] Del mismo modo, los grupos nucleófilos en una fracción del fármaco incluyen, aunque sin limitarse a, los siguientes compuestos: los grupos amino, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y grupos de aril-hidracida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en las fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluro de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos.

[00370] Alternativamente, es posible producir una proteína de fusión que contenga el anticuerpo y el agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede incluir regiones respectivas que codifiquen las dos porciones del conjugado, ya sean adyacentes o estén separadas por una región que codifique un péptido enlazador que no destruya las propiedades deseadas del conjugado.

[00371] En otra forma de realización, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como la estreptavidina) y actuar previamente contra el tumor, donde se administra al paciente el conjugado receptor del anticuerpo, luego, se elimina de la circulación el conjugado no unido, utilizando un agente de eliminación, y posteriormente se administra un "ligando" (por ejemplo, la avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

[00372] *Modificaciones covalentes de los polipéptidos de ALK-1*

[00373] En el ámbito de la presente invención se incluyen las modificaciones covalentes de los polipéptidos antagonistas (por ejemplo, un fragmento de polipéptido antagonista, una molécula de fusión de ALK-1, tal como una inmunoadhesina de ALK-1° un anticuerpo anti-ALK-1). Dichas modificaciones pueden ser síntesis químicas o una

escisión enzimática o química del polipéptido, de ser aplicable. En la molécula se introducen otros tipos de modificaciones covalentes del polipéptido mediante la reacción dirigida de residuos de aminoácidos del polipéptido con un agente derivativo orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos en el extremo terminal N o C, o por medio de la incorporación de un aminoácido modificado o no natural a la cadena del polipéptido en formación, por ejemplo, Ellman y col. *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991); Noren y col. *Science* 244:182 (1989); y, las publicaciones de aplicación de la patente de EE.UU. núms. 20030108885 y 20030082575.

[00374] Los residuos cisteinilos reaccionan generalmente con haloacetatos- α (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para producir derivados de carboximetil o carboxiamidometil. Los residuos cisteinilos también se derivan mediante reacciones con bromotrifluoroacetona, α -bromo- β -(5-imidozoi) ácido propiónico, fosfato cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, 3-nitro-2-piridil disulfuro, metil 2-piridil disulfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

[00375] Los residuos histidilos se derivan mediante reacción con dietilpirocarbonato con pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilos. El bromuro para-bromofenacil también es útil y la reacción se lleva a cabo generalmente en cacodilato de sodio 0,1 M con pH 6,0.

[00376] Los residuos lisinilos y de amino terminales reaccionan con anhídridos succínicos u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos lisinilos. Otros reactivos para la derivatización de residuos que contengan α -amino incluyen imidoésteres tales como metil picolinimidato, fosfato de piroxidal, piroxidal, cloroborohídrido, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

[00377] Los residuos arginilos se modifican mediante reacción con uno o más reactivos convencionales, entre los que se encuentran fenilglioxal, 2,3-butanediona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se lleve a cabo en condiciones alcalinas debido al alto pK_a del grupo funcional de guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como también con los grupos amino epsilon de arginina.

[00378] La modificación específica de los residuos tirosilos puede realizarse con un interés especial en la inserción de etiquetas espectrales en dichos residuos mediante la reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Generalmente, se utilizan N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies de tirosilos O-acetilos y

derivados de 3-nitro, respectivamente. Los residuos tirosilos se yodan utilizando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas marcadas para utilizarlas en radioinmunoensayos.

[00379] Los grupos laterales carboxilos (aspartil o glutamil) se modifican selectivamente mediante reacción con carbodiimidas ($\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$), en las que R y R' son diferentes grupos alquilos, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Además, los residuos aspartilos y glutamilos se convierten en residuos asparaginilos y glutaminilos mediante reacción con iones de amonio.

[00380] Los residuos glutaminilos y asparaginilos se desamidán frecuentemente a los residuos glutamilos y aspartilos correspondientes, respectivamente. Estos residuos se desamidán en condiciones neutrales o básicas. La forma desamidada de estos residuos se encuentra dentro del campo de la presente invención.

[00381] Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilos de residuos serilos y treonilos, metilación de grupos α -amino de lisina, arginina y cadenas laterales de histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)), acetilación de amino N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

[00382] Otro tipo de modificación covalente implica el apareamiento químico o enzimático de glicosidas a un polipéptido de la invención. Estos procedimientos tienen la ventaja de que no requieren la producción del polipéptido en una célula huésped que tenga capacidades de glicosilación para la glicosilación unida por enlace N o O. Dependiendo del modo de apareamiento utilizado, el azúcar o los azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilos libres, (c) grupos sulfhidrilos libres, tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilos libres, tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos, tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330, publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, págs. 259-306 (1981).

[00383] La eliminación de cualquier porción de carbohidratos presente en un polipéptido de la invención deberá realizarse química o enzimáticamente. La deglicosilación química requiere la exposición del polipéptido al compuesto de ácido trifluorometanosulfónico u otro compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de casi todos o todos los azúcares, excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que el polipéptido permanece intacto. La deglicosilación química se describe en Hakimuddin y col., *Arch. Biochem. Biophys.*

259:52 (1987) y en Edge y col., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). La escisión enzimática de porciones de carbohidratos, como por ejemplo, en anticuerpos, puede llevarse a cabo mediante el uso de diversas endo- y exo-glicosidasas, tal como se describe en Thotakura y col., *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987).

[00384] Otro tipo de modificación covalente de un polipéptido de la invención comprende la unión del polipéptido a uno de diversos polímeros no proteínicos, como por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, tal como se establece en la patentes de Estados Unidos n.º 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

[00385] *Formulaciones farmacéuticas*

[00386] Las formulaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo o inmunoadhesina de la invención se preparan para su conservación mediante la mezcla de anticuerpos con el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000)), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones liofilizadas. Los vehículos, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en todas las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones tamponadas tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como por ejemplo, cloruro amonio de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; alcohol bencilo, fenol o butilo benzil alcohol; alquil parabeno como el metal o propel parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); bajo peso molecular (menos de 10 residuos) polipéptidos; proteínas, como cera albúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidroílicos como la polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicerina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes como la EDTA; azúcares como sucrosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones de formación salina como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensoactivos no surfactantes como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

[00387] La formulación de la presente memoria descriptiva también contiene más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. Dichas moléculas están presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende.

[00388] Los principios activos también se pueden atrapar en microcápsulas

preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Estas técnicas se divulgan en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000).

[00389] Las formulaciones para administrar *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

[00390] Se pueden elaborar preparaciones de liberación controlada. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación controlada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli-(2-hidroxietilmetacrilato), o poli-(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de EE.UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido glicólico-ácido láctico como por ejemplo, LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros como el acetato de etileno-vinilo y el ácido glicólico-ácido láctico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo menores. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el organismo por un largo periodo de tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, lo que ocasiona una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Es posible concebir estrategias racionales para su estabilización dependiendo del mecanismo que intervenga. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es de formación de uniones intermoleculares S-S mediante el intercambio tio-bisulfuro, se puede lograr la estabilidad mediante la modificación de los residuos sulfidrilos, liofilizando soluciones ácidas, controlando la humedad, utilizando aditivos adecuados, y desarrollando composiciones de matrices de polímeros específicas.

[00391] También se contempla que un agente útil en la invención se pueda introducir en un sujeto mediante terapia génica. La terapia génica hace referencia a la terapia que se lleva a cabo mediante la administración de un ácido nucleico a un sujeto. En las aplicaciones de terapia génica, los genes se introducen en las células con el fin de obtener la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente efectivo para, por ejemplo,

reemplazar un gen defectuoso. La "terapia génica" comprende tanto la terapia génica convencional, en la que se obtiene un efecto duradero mediante un único tratamiento, como la administración de agentes génicos terapéuticos, lo cual implica la administración única o reiterada de un ADN o ARNm terapéuticamente efectivo. Los ADN y ARN o siARN antisentido se pueden utilizar como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. Ya se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido cortos pueden importarse en las células donde actúen como inhibidores, a pesar de contar con concentraciones intracelulares bajas debido a que su absorción por parte de la membrana celular es restringida. (Zamecnik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 (1986)). Es posible modificar los oligonucleótidos para aumentar su absorción, por ejemplo, sustituyendo sus grupos de fosfodiéster con carga negativa por grupos sin carga. Para obtener revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase, por ejemplo, Goldspiel y col., Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu y Wu Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan Science 260:926-932 (1993); Morgan y Anderson Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); y May TIBTECH 11:155-215 (1993). Los métodos habitualmente conocidos en el sector acerca de la técnica del ADN recombinante que se pueden utilizar se describen en Ausubel y col., editores (1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; y Kriegler (1990) Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY.

[00392] Dosificación y administración

[00393] Las moléculas se administran a un paciente humano de acuerdo con los procedimientos conocidos, como por ejemplo la administración intravenosa como un bolo o una infusión continua durante un período de tiempo, mediante vías intramusculares, intraperitoneales, cefalorraquídeas, subcutáneas, intraarticulares, intrasinoviales, intratecales, orales, tópicas o por inhalación.

[00394] En algunas realizaciones el tratamiento de la invención implica la administración combinada de un antagonista de un ALK-1 y de uno o más agentes antineoplásicos, por ejemplo, agentes antiangiogénesis o agentes antilinfoangiogénesis. En una forma de realización están presentes agentes antineoplásicos adicionales, por ejemplo, uno o más agentes antiangiogénicos diferentes, uno o más agentes quimioterapéuticos, etc. La invención también contempla la administración de inhibidores múltiples, por ejemplo, anticuerpos múltiples para el mismo antígeno o anticuerpos múltiples para diferentes moléculas activas del cáncer. En una realización se administró un cóctel de diferentes agentes quimioterapéuticos con el antagonista de la ALK-1 y/o uno más agentes antiangiogénesis. La administración combinada incluye la coadministración, usando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única y/o la administración

consecutiva en cualquier orden. Por ejemplo, un antagonista de ALK-1 puede preceder, seguir o alternarse con la administración de los agentes antineoplásicos o puede administrarse simultáneamente con ellos. En una forma de realización, existe un periodo en el cual ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

[00395] Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada del antagonista del ALK-1 dependerá del tipo de enfermedad que debe tratarse, tal y como se define anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el inhibidor se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al inhibidor, y el criterio del médico tratante. El inhibidor se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. En un tratamiento combinado, las composiciones de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz o sinérgica. Como se usa en la presente memoria, una cantidad terapéuticamente eficaz es la que consigue que la administración de una composición de la invención y/o la coadministración de un antagonista del ALK-1 y de uno o más agentes terapéuticos dé como resultado la reducción o inhibición de la enfermedad o estado que se combate. El efecto de la administración de una combinación de agentes puede ser aditivo. En una forma de realización, el resultado de la administración es un efecto sinérgico. Una cantidad terapéuticamente sinérgica es la cantidad de antagonista del ALK-1 y de uno o más agentes terapéuticos., por ejemplo, un inhibidor de la angiogénesis, necesaria para reducir sinérgica o significativamente o eliminar los estados o síntomas asociados a una enfermedad determinada.

[00396] Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis inicial potencial para la administración a un paciente es de aproximadamente 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20mg/kg) de antagonista del ALK-1 o de un inhibidor de la angiogénesis, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante una infusión continua. Una dosis diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que ocurra la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. No obstante, otros regímenes de dosificación también pueden ser útiles. Generalmente, el médico administrará una o más moléculas hasta alcanzar la dosis que proporcione el efecto biológico requerido. El progreso del tratamiento de la invención se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

[00397] Por ejemplo, la preparación y programación de las dosis para los inhibidores de la angiogénesis, por ejemplo, los anticuerpos anti-VEGF, como AVASTIN®

(Genentech), pueden realizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según lo determinado empíricamente por el médico calificado. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis inicial potencial para la administración en un paciente es de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (por ej. 0,1-20 mg/kg) de antagonista de VEGF específico, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. La dosis diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En algunas formas de realización, las dosis particularmente deseables incluyen, por ejemplo, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg y 15 mg/kg. Dependiendo de la afección, para administraciones repetidas durante varios días o más, se mantiene el tratamiento hasta que el cáncer haya sido tratado, midiendo con los métodos descritos anteriormente u otros conocidos en la materia. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. En un ejemplo, si el antagonista de VEGF específico es un anticuerpo, el anticuerpo de la invención se administra una vez a la semana, cada dos semanas o cada tres semanas a una dosis de alrededor de 5 mg/kg hasta alrededor de 15 mg/kg, incluyendo pero sin limitarse a, 7,5 mg/kg o 10 mg/kg. El progreso de la terapia de la invención se monitorea fácilmente con técnicas y ensayos convencionales.

[00398] En un ejemplo, bevacizumab es el antagonista VEGF específico. Para usos terapéuticos, bevacizumab se proporciona en viales sin preservantes, de uso único, de 100 mg y 400 mg para administrar 4 ml o 16 ml de bevacizumab (25 mg/ml). Los 100 mg de producto se formulan en 240 mg de α, α-trehalosa deshidratada, 23,2 mg de fosfato de sodio (monobásico, monohidratado), 4,8 mg de fosfato de sodio (dibásico, anhídrido), 1,6 mg de polisorbato 20 y agua para inyección, grado USP. Los 400 mg de producto se formulan en 960 mg de α, α-trehalosa deshidratada, 92,8 mg de fosfato de sodio (monobásico, monohidratado), 19,2 mg de fosfato de sodio (dibásico, anhídrido), 6,4 mg de polisorbato 20 y agua para inyección, grado USP.

[00399] En otro ejemplo, la preparación y programación de las dosis para dichos agentes quimioterapéuticos puede realizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o tal y como lo determine empíricamente el médico cualificado. La preparación y la pauta posológica de los ciclos de quimioterapia se describen también en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

[00400] *Eficacia del tratamiento*

[00401] La eficacia del tratamiento de la invención puede medirse mediante diversos puntos de valoración comúnmente usados en la evaluación de los trastornos neoplásicos o no neoplásicos. Por ejemplo, los tratamientos contra el cáncer pueden evaluarse mediante,

por ejemplo, aunque sin limitarse a ello, la regresión del tumor, la reducción del peso o el tamaño del tumor, el tiempo de progresión, la duración de supervivencia, la supervivencia sin progresión, la duración de respuesta y la calidad de vida. Puesto que los agentes antiangiogénicos aquí descritos tienen como objetivo la vasculatura del tumor y no necesariamente a las células neoplásicas, representan una clase única de fármacos contra el cáncer y por lo tanto pueden requerir mediciones y definiciones únicas de las respuestas clínicas a los fármacos. Por ejemplo, una reducción del tumor superior al 50 % en un análisis bidimensional es el límite estándar para proclamar una respuesta. Sin embargo, los inhibidores pueden provocar inhibición de la extensión metastásica sin reducción del tumor original, o simplemente pueden tener un efecto tumorestático. Por lo tanto, pueden emplearse distintos procedimientos para determinar la eficacia de la terapia, entre los que se incluyen a modo de ejemplo, la medición del plasma o de los marcadores urinarios de la angiogénesis y la medición de la respuesta a través de imágenes radiológicas.

[00402] Los siguientes Ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y de ningún modo se proponen limitar el alcance de los conocimientos que se presentan en la presente memoria descriptiva.

[00403] EJEMPLOS

[00404] **Ejemplo 1: Generación de una molécula ALK1.Fc**

[00405] Mediante las técnicas estándar de biología molecular, se generó una molécula ALK1.Fc al unir el dominio extracelular de ALK-1 (residuos de los aminoácidos 1-118 del ALK-1 humano) a la región Fc de la IgG₁ humana por medio de un enlazador de polipéptidos. Brevemente, un fragmento extracelular de ALK-1 humano (aminoácidos 1-118) se subclonó en un vector pRK5 vector que se había diseñado para la expresión de la proteína de fusión con un Fc del extremo C terminal de IgG1 humana. ALK1.Fc se purificó con cromatografía de afinidad con proteína A del medio condicionado, extraído del cultivo libre de suero de células CHO transfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión. La molécula ALK1.Fc tiene las siguientes secuencias de ADNc y de aminoácidos:

Secuencia ADNc de ALK1.Fc:

ATGACCTTGGGCTCCCCCAGGAAAGGCCTTCTGATGCTGCTGATGGCCTTGGTG
ACCCAGGGAGACCCTGTGAAGCCGTCTCGGGGCCCCGCTGGTGACCTGCACGTG
TGAGAGCCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGGGGGGCCTGGTGACAGTAG
TGCTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCTGCGGGAA
CTTGACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACT
GCTGCGACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACC
CAACCTCCTTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAGACCGGTGTCACCGACAA
AGCTGCGCACTATACTCTGTGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG

ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG
 GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGCCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG
 TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
 CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCT
 CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
 AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
 CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAA
 CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT
 GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAG
 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT
 GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
 (identificador de secuencia n.º: 1)

Secuencia de proteína de ALK1.Fc:

MTLGSPRKGLMLLMALVTQGPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVV
 LVREEGRHPQEHRCGNLHRELCRGRPTEFVNHYCCDSHLCNHNVS LVLEATQPP
 SEQPGTDGQTGVTDKAAHYTLCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (identificador de secuencia n.º: 2)

[00406] Ejemplo 2: El tratamiento con ALK1.Fc mejora el brote de células endoteliales in vitro

[00407] Se observó el efecto de la inhibición de la señalización de ALK-1 en el crecimiento de las células endoteliales mediante el ensayo de brotes celulares HUVEC en geles de fibrina. Los detalles del ensayo de brotes celulares HUVEC en geles de fibrina se han descrito anteriormente en (Nakatsu, MN, Microvascular Research 44:102-112 (2003)). Brevemente, las partículas Cytodex 3 (Amersham Pharmacia Biotech) se recubrieron con 350-400 células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) por partícula en 2 ml de medio EGM-2 (Clonetics). Unas 200 partículas recubiertas con HUVEC se introdujeron en un coágulo de fibrina en un pocillo de una placa para cultivo tisular de 12 pocillos. 80 X 10³ células de fibroblasto humano D551 se colocaron en las placas sobre el coágulo y el medio se cambió cada 2 días. Se agregó ALK1.Fc al medio de cultivo a 5µg/ml. El día 9 se obtuvieron imágenes por microscopía de contraste de imágenes.

[00408] Las HUVEC que crecen en gel de fibrina en presencia del cocultivo de células de fibroblasto humano brotan con una estructura distintiva, similares al lumen (Nakatsu, M. N. y col. Microvasc Res 66, 102-12 (2003)). La adición de ALK1.Fc aumentó bastante la longitud de los brotes (Figura 1), lo que sugiere que el bloqueo de la señalización de ALK-1 permitió que las células endoteliales se adaptaran a un comportamiento más exploratorio. Estos resultados indican que la ALK1.Fc fue capaz de afectar a las células endoteliales mediante el secuestro del ligando de ALK-1 y la

prevención de la activación del ALK-1 endógeno.

[00409] Ejemplo 3: El tratamiento con ALK1-Fc afecta el desarrollo vascular de la retina in vivo

[00410] Se utilizaron ratas SD recién nacidas de la misma camada para estudiar el efecto de ALK1.Fc en el desarrollo vascular de la retina. A las ratas se les inyectó ALK1.Fc (10 mg/kg de peso corporal) por vía intraperitoneal el día postnatal 4 (P4), P6 y P9. El día P11, se anestesió a las ratas con Isoflurano. Se les administró de forma intracardiaca Lectina Lycopersicon Esculentum marcada con FITC (150 µg en 150 µl de NaCl al 0,9 %; Vector Laboratories) y se permitió que circulara durante 3 min. Se extrajeron los ojos y se fijaron con PFA al 4 % en PBS durante toda la noche y luego se lavaron con PBS. Las retinas disecadas se bloquearon con suero de cabra al 10 % en PBST (PBS, 0,5 % Triton X-100) durante 3 horas, luego se incubaron durante la noche con isolectina biotinilada B4 (1:100, Bandeiraea simplicifolia; Molecular Probe) o con el conjugado de Cy3 y anti-alfa actina del músculo (ASMA, 1:200, Sigma-Aldrich), con suero de cabra al 10 % en PBST. Para visualizar la isolectina biotinilada B4, se lavaron 4 veces las retinas con PBST, y se incubaron durante la noche con Cy3-estreptavidina (1:200, Sigma-Aldrich). Al completar la tinción, se lavaron las retinas 4 veces con PBST. Todas las incubaciones de una noche de duración se efectuaron a 4 °C. Se obtuvieron imágenes de las retinas montadas de plano mediante microscopio fluorescente confocal.

[00411] En la etapa temprana postnatal la retina de rata desarrolla un patrón vascular estereotípico en una secuencia de eventos bien definida. La vasculatura superficial de la retina se desarrolla como una red que se expande de la cabeza del nervio óptico, con brotes activos en la periferia y una extensa remodelación en el centro. Se pueden seguir fácilmente los diferentes aspectos del desarrollo de los vasos, por ejemplo, el brote, remodelación y maduración de los vasos, así como la especificación arterial-venosa. En la mayoría de las retinas tratadas con ALK1.Fc, no se afectó el patrón característico de arterias y venas alternas radialmente. Sin embargo, hubo un aumento claro de la densidad vascular, especialmente los microvasos cercanos a las venas (Isolectina-Cy3; Figura 2). Además, hubo una reducción marcada de la perfusión sanguínea en los microvasos y venas (Lectina-FITC; Figuras 3 & 4). Curiosamente, las arterias de la retina se vieron agrandadas, de manera similar al defecto vascular que se observó en los embriones con deficiencia de ALK-1. Además, las arterias agrandadas de la retina tienen una cobertura vascular desorganizada de células de músculo liso (ASMA; Figuras 3 y 4). Estos resultados indican que el tratamiento con ALK1.Fc fue capaz de afectar el desarrollo vascular de la retina de ratas recién nacidas al interferir con la señalización del ALK-1 in

vivo.

[00412] Ejemplo 4: El tratamiento con ALK1-Fc inhibe el crecimiento tumoral in vivo

[00413] Para estudiar si la señalización del ALK-1 se involucra directamente en el crecimiento tumoral, analizamos el efecto de ALK1.Fc sobre la angiogénesis tumoral y el crecimiento tumoral en ratones desnudos con xenotrasplantes subcutáneos de tumor humano. Se mantuvo ratones atímicos desnudos (Charles River Laboratories, Hollister, California) según lo establecido para el cuidado y uso de animales de laboratorio. En cada estudio se utilizaron hembras de ratones de seis a ocho semanas de nacidas. Para obtener tumores subcutáneos, se inyectó a los ratones 0,1 ml de una suspensión de células tumorales que contenía matrigel al 50 % (BD Bioscience) en el flanco posterior derecho. A cada ratón se le inyectó 5×10^6 células HM7 de cáncer de colon humano, 10×10^6 células MV-522 de carcinoma de pulmón humano, 1×10^6 células C6 de glioblastoma de rata o 10×10^6 células Calu6 de carcinoma de pulmón humano. Se les administró ALK1.Fc (10mg/kg) por vía intraperitoneal, como sigue: El tratamiento con HM7 ALK1.Fc (q/2d) se inició 3 días después de la inoculación del tumor, el tratamiento con MV-522 ALK1.Fc (q/2d) se inició 16 días después de la inoculación del tumor, el tratamiento con C6 ALK1.Fc (2x/w) se inició 3 días después de la inoculación del tumor y el tratamiento con Calu6 ALK1.Fc (q/2d) se inició 22 días después de la inoculación del tumor. El crecimiento tumoral se cuantificó mediante mediciones con un calibrador. El volumen del tumor (mm^3) se determinó midiendo su longitud (l) y ancho (w) y calculando el volumen ($V = lw^2/2$). En cada grupo se incluyó de 10 a 15 animales.

[00414] El tratamiento con ALK1.Fc inhibió significativamente el crecimiento del tumor en comparación con el tratamiento con vehículo (Figuras 5 & 6). El efecto en el crecimiento del tumor se observó en todos los modelos de xenotrasplante de tumor, lo que indica que los efectos antineoplásicos observados no son específicos para el tipo de tumor.

[00415] Ejemplo 5: Combinación de ALK1-Fc y anti-VEGF

[00416] En el estudio del tumor HM7 descrito anteriormente en el Ejemplo 4, el tratamiento con ALK1.Fc se inició tres días después de la inoculación de las células tumorales. La actividad de inhibición del crecimiento tumoral de ALK1.Fc se redujo cuando se inició el tratamiento (10 mg/kg a q/3d) nueve días después de la inoculación de las células tumorales (Figura 7). Este tratamiento modelo con anticuerpos anti-VEGF (B20-4.1, 5 mg/kg a q/3d) también fue menos efectivo cuando el tratamiento se retrasó. Sin embargo, se observó un efecto aditivo significativo cuando ambos agentes se administraron en combinación (Figura 7). El efecto combinado del anticuerpo anti-VEGF y ALK1.Fc también se estudió en el modelo de xenotrasplante de LL2. Se inyectó 5×10^6 células LL2

de carcinoma de pulmón lewis a cada ratón y el tratamiento con ALK1.Fc (10 mg/kg a q/2d) y anticuerpo anti-VEGF (5 mg/kg a q/2d) se inició 2 días después de la inoculación del tumor. Los resultados demuestran que la terapia combinada del modelo de tumor LL2 dio como resultado una eficacia antineoplásica mucho mayor en comparación con la monoterapia (Figura 8).

[00417] El efecto del anticuerpo anti-VEGF y ALK1.Fc en la densidad vascular del tumor, por evaluación por tinción con CD31, se examinó en el modelo de tumor LL2. El día 18 después de la inoculación de las células tumorales, se extrajeron los tumores y se fijaron por inmersión en paraformaldehído (PFA) al 1 % en PBS durante 2 horas, seguido de la incubación durante toda la noche en sucrosa al 30 % para crioprotección. Las muestras se insertaron en OCT y se prepararon secciones de un grosor de 40µm, las cuales se tiñeron con CD31 anti-ratón (1:50, BD Pharmingen), y luego con conjugado de FITC-IgG anti-rata de cabra. Según lo esperado, el tratamiento con anticuerpo anti-VEGF solo redujo significativamente la densidad vascular en los tumores tratados. Sin embargo, el tratamiento con ALK1.Fc tuvo un efecto marginal en la densidad vascular del tumor. Sorprendentemente, el tratamiento con ambos agentes dio como resultado una reducción más marcada aún de la densidad vascular del tumor (Figura 9), consistente con el efecto aditivo antineoplásico. En conjunto, estos resultados demostraron que el bloqueo de la señalización del ALK-1 con ALK1.Fc podría tener una amplia eficacia antineoplásica, especialmente cuando se combina con el anticuerpo anti-VEGF.

[00418] **Ejemplo 6: El tratamiento con ALK1-Fc afecta el desarrollo de la vasculatura linfática in vivo**

[00419] Se utilizaron ratones recién nacidos CD1 de la misma camada para estudiar el efecto de ALK1.Fc en la linfoangiogénesis. A los ratones se les inyectó ALK1.Fc ((10 mg/kg de peso corporal) intraperitonealmente el día postnatal 1 (P1), P3 y P6 y luego se cosechó el tejido el P9. Los intestinos delgados se extrajeron en bloque y se lavaron con PBS. Se separó la dermis de la epidermis de la piel de la cola, se lavó con PBS y luego se utilizó para la siguiente tinción. Los tejidos se fijaron durante 2 horas con PFA al 4 % en PBS a temperatura ambiente. Después de bloquearlos con PHT1 (suero de cabra al 5 %, BSA al 0,2 %, Triton X-100 al 0,5 %, NaN₃ en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente, se incubaron durante toda la noche los tejidos con anti-CD31 de rata (1:50, BD Pharmingen) y anti-LYVE-1 policlonal de conejo (1:500, Upstate), en PHT1. Para visualizar los complejos antígeno-anticuerpo, se utilizó conjugado secundario de AlexaFluor 488-anti-rata de cabra (1:400, Molecular Probes) y AlexaFluor594-anti-conejo de cabra (1:400, Molecular Probes) en PHT2 (BSA al 2 %, Triton X-100 al 0,5 %, en PBS).

Al completarse la tinción, los tejidos se lavaron 4 veces con PBST (PBS, Triton X-100 al 0,5 %), fijados posteriormente con PFA al 4 % en PBS durante 5-10 min. a temperatura ambiente, seguido de otras 4 lavadas con PBS. Todas las incubaciones de una noche de duración se efectuaron a 4 °C. Se obtuvieron imágenes de los tejidos montados en plano mediante microscopio fluorescente confocal.

[00420] En los intestinos delgados de los ratones recién nacidos tratados con ALK1.Fc, los vasos capilares sanguíneos (tinción de CD31) de los vellos se mostraron normales, a pesar de que los vellos eran moderadamente más cortos que los de control (Figuras 10 y 11). En contraste, los capilares linfáticos (tinción de LYVE-1) se vieron seriamente afectados. No se extendieron completamente en los vellos y la mayoría estaban localizados en la base de los vellos.

[00421] La red vascular linfática en la piel de la cola de los ratones recién nacidos también se alteró marcadamente después del tratamiento con ALK1.Fc (Figura 12). El patrón característico de panal estaba interrumpido en la mayor parte, únicamente con vasos linfáticos fragmentados y desorganizados. Estos resultados indican que además de su rol crítico en la regulación de la formación de vasos sanguíneos, la señalización ALK-1 también es esencial para el desarrollo postnatal de la vasculatura linfática.

[00422] **Ejemplo 7: El tratamiento con ALK1-Fc afecta la organización de los pericitos**

[00423] Se examinó el efecto del tratamiento con ALK1.Fc en la organización de los pericitos de los vasos del tumor. A los ratones desnudos Beige se les inyectó una suspensión de 0,1 ml de suspensión de células tumorales que contenía matrigel al 50 % (BD Bioscience) en el flanco posterior derecho. A cada ratón se le inyectó 5×10^6 células TIB68 de leucemia monocítica de ratón (BALB/c-derivadas que se considera representan una etapa temprana de la diferenciación monocito-mielocito) para establecer los tumores subcutáneos. Se les administró Alk1.Fc (10mg/kg) o vehículo de control (PBS) por vía intraperitoneal cada tres días. Los tratamientos se iniciaron al día siguiente de la inoculación celular y se terminaron 16 días después de la primera dosis. Los tumores se fijaron durante 2 horas con paraformaldehído (PFA) al 4 % a temperatura ambiente (RT), se lavaron con PBS, se transfirieron a sucrosa al 30 % a 4 °C durante la noche y se embebieron con OCT. Se lavaron secciones de 80 μ m del tejido del tumor en PBS, se bloquearon con PHT1 (PBS/suero de cabra al 10 %/Triton X-100 al 0,5 %) a RT durante 2 horas y se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en PHT2 (PBS/suero de cabra al 2 %/Triton X-100 al 0,5 %) a 4 °C durante la noche (CD31 anti-ratón de rata, 1:50, BD

Pharmingen; anti-Desmin de conejo, 1:400, GeneTex). Después de 4 lavados con PBS/Triton X-100 al 0,2 %, se incubaron las secciones con los anticuerpos secundarios (Alexa 488-anti-rata de cabra; Alexa 594-anti-ratón de conejo, 1:400, Molecular Probes) a temperatura ambiente durante 2 horas. Las secciones se lavaron con PBS/Triton X-100 al 0,2 % seguido de PBS, se fijaron con PFA al 4 % a temperatura ambiente durante 5 minutos y finalmente se lavaron con PBS. Estos resultados demuestran que los vasos del tumor tratado con ALK1.Fc presentan pericitos mal organizados y sueltos (Figura 13).

[00424] Ejemplo 8: Generación de moléculas adicionales de ALK-1

[00425] Se utilizaron técnicas estándar de biología molecular para generar las siguientes moléculas adicionales:

Secuencia ADNc de ALK1.Fc.2:

ATGACCTTGGGCTCCCCCAGGAAAGGCCTTCTGATGCTGCTGATGGCCTTGGTG
ACCCAGGGAGACCCTGTGAAGCCGTCTCGGGGCCCGCTGGTGACCTGCACGTG
TGAGAGCCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGGGGGGCCTGGTGACAGTAG
TGCTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCTGCGGGAA
CTTGACAGGGAGCTCTGCAGGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACT
GCTGCGACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACC
CAACCTCCTTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAGACCGGTGTCACCGACAA
AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG
TCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG
AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC
CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT
CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAG (identificador
de secuencia n.º: 3)

Secuencia de proteínas de ALK1.Fc.2:

MTLGSPRKGLLMLLMALVTQGPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVV
LVREEGRHPQEHRCGNLHRELCRGRPTFEVNHYYCCDSHLCNHNVS LVLEATQPP
SEQPGTDGQTGVTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (identificador de secuencia n.º: 4)

Secuencia ADNc de ALK1.Fc.3:

ATGACCTTGGGCTCCCCCAGGAAAGGCCTTCTGATGCTGCTGATGGCCTTGGTG
ACCCAGGGAGACCCTGTGAAGCCGTCTCGGGGCCCGCTGGTGACCTGCACGTG
TGAGAGCCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGGGGGGCCTGGTGACAGTAG

TGCTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCTGCGGGAA
 CTTGCACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACT
 GCTGCGACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACC
 CAACCTCCTTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAGACCGGTGACAAAACCTCA
 CACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCT
 CTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
 ATGCGTGGTGGTGGCCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT
 ACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
 GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT
 GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT
 GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGA
 CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
 AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA
 CGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
 CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (identificador de secuencia n.º:
 5)

Secuencia de proteínas de ALK1.Fc.3:

MTLGSPRKGLLMLLMALVTQGDPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVV
 LVREEGRHPQEHRCGNLHRELGRPTEFVNHYCCDSHLCNHNVS LVLEATQPP
 SEQPGTDGQTGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (identificador de secuencia n.º: 6)

Secuencia ADNc de ALK1.Fc.4:

ATGACCTTGGGCTCCCCCAGGAAAGGCCTTCTGATGCTGCTGATGGCCTTGGTG
 ACCCAGGGAGACCCTGTGAAGCCGTCTCGGGGGCCCGCTGGTGACCTGCACGTG
 TGAGAGCCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGGGGGGCCTGGTGACAGTAG
 TGCTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCTGCGGGAA
 CTTGCACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACT
 GCTGCGACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACC
 CAACCTCCTTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAGGAGCCCAAATCTTGTGA
 CAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT
 CAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
 CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG
 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
 GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC
 ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
 CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
 ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG
 TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
 GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT
 GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA
 GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (identificador
 de secuencia n.º: 7)

125

Secuencia de proteínas de ALK1.Fc.4:

MTLGSPRKGLLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVV
LVREEGRHPQEHRGCGNLHRELCRGRPTEFVNHYCCDSHLCNHNVS LVLEATQPP
SEQPGTDGQEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (identificador de secuencia n.º: 8)

Secuencia ADNc de ALK1.Fc.5:

ATGACCTTGGGCTCCCCCAGGAAAGGCCTTCTGATGCTGCTGATGGCCTTGGTG
ACCCAGGGAGACCCTGTGAAGCCGTCTCGGGGCCCGCTGGTGACCTGCACGTG
TGAGAGCCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGGGGGGCCTGGTGACACAGTAG
TGCTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCTGCGGGAA
CTTGACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACT
GCTGCGACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACC
CAACCTCCTTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAGGAGCCCAAATCTTCTGA
CAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT
CAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC
ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG
TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAG
(identificador de secuencia n.º: 9)

Secuencia de proteínas de ALK1.Fc.5:

MTLGSPRKGLLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVV
LVREEGRHPQEHRGCGNLHRELCRGRPTEFVNHYCCDSHLCNHNVS LVLEATQPP
SEQPGTDGQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (identificador de secuencia n.º: 10)

- [00426]

Ejemplo 9: El tratamiento con inmunoadhesinas de ALK1 afecta el desarrollo vascular de la retina in vivo
- [00427]

A ratones se les inyectó ALK1.Fc, ALK1.Fc.2, ALK1.Fc.4 o ALK1.Fc.5 (10 mg/kg de peso corporal) por vía intraperitoneal los días postnatales 4 (P4) y P6. El día P8, se anestesió a los ratones. Se extrajeron los ojos y se fijaron con PFA al 4 % en PBS durante toda la noche y luego se lavaron con PBS. Las retinas disecadas se bloquearon con

suero de cabra al 10 % en PBST (PBS, Triton X-100 al 0,5 %) durante 3 horas y luego se incubaron durante toda la noche con anti-CD31 de rata (1:50, BD Pharmingen) en PBST. Para visualizar el anti-CD31, se incubaron las retinas con conjugado AlexaFluor 488-anti-rata de cabra (1:400, Molecular Probes) en PBST. Al completar la tinción, se lavaron las retinas 4 veces con PBST. Todas las incubaciones de una noche de duración se efectuaron a 4 °C. Se obtuvieron imágenes de las retinas montadas de plano mediante microscopio fluorescente confocal.

[00428] En la etapa temprana postnatal la retina de ratón desarrolla un patrón vascular estereotípico en una secuencia de eventos bien definida. La vasculatura superficial de la retina se desarrolla como una red que se expande de la cabeza del nervio óptico, con brotes activos en la periferia y una extensa remodelación en el centro. Se pueden seguir fácilmente los diferentes aspectos del desarrollo de los vasos, por ejemplo, el brote, remodelación y maduración de los vasos, así como la especificación arterial-venosa. En las retinas tratadas con inmunoadhesina de ALK-1 (ALK1.Fc, ALK1.Fc.2, ALK1.Fc.4 y ALK1.Fc.5) no se alteró el patrón característico de arterias y venas alternas radialmente. Sin embargo, hubo un aumento claro de la densidad vascular, especialmente en los microvasos cercanos a las venas (Figura 14). Estos resultados indican que los efectos del tratamiento con las inmunoadhesinas de ALK1 adicionales (ALK1.Fc.2, ALK1.Fc.4 y ALK1.Fc.5) en el desarrollo vascular de la retina de los ratones recién nacidos es similar al observado con el tratamiento con ALK1.Fc.

Las reivindicaciones son:

1. Un método de inhibición de la linfoangiogénesis que comprende la administración de una cantidad eficaz de un antagonista ALK-1 a un sujeto que requiera de la inhibición de la linfoangiogénesis, donde se inhibe la linfoangiogénesis.

2. El método de la reivindicación 1, donde el sujeto tiene, por ejemplo, un tumor, cáncer, un trastorno proliferativo, degeneración macular, una enfermedad mediada por la inflamación, artritis reumatoide, retinopatía diabética o psoriasis.

3. Un método para el tratamiento de afecciones patológicas asociadas con la linfoangiogénesis en un sujeto y comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, donde se trata la afección patológica asociada con la linfoangiogénesis.

4. El método de la reivindicación 3, donde una afección patológica asociada con la linfoangiogénesis es un tumor, cáncer, un trastorno proliferativo, degeneración macular, una enfermedad mediada por la inflamación, artritis reumatoide, retinopatía diabética o psoriasis.

5. El método de la reivindicación 2 ó 4, donde el tumor, cáncer o trastorno de proliferación celular es carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma o leucemia.

6. Un método de inhibición de la linfoangiogénesis tumoral en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, donde se inhibe la linfoangiogénesis tumoral.

7. Un método de inhibición o prevención de la metástasis del tumor en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, donde se inhibe o previene la metástasis del tumor.

8. El método de la reivindicación 6 ó 7, donde el sujeto ha desarrollado o está en riesgo de desarrollar metástasis tumoral.

9. El método de la reivindicación 8, donde dicha metástasis tumoral ocurre en el sistema linfático.

10. El método de la reivindicación 8, donde dicha metástasis tumoral ocurre en un órgano distante.

11. Un método de alteración de la organización de los pericitos en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, donde se altera la organización de los pericitos.

12. El método de la reivindicación 11, donde el sujeto tiene, por ejemplo, un tumor, cáncer, un trastorno proliferativo, degeneración macular, una enfermedad mediada por la inflamación, artritis reumatoide, retinopatía diabética o psoriasis.

128

13. Un método de inhibición del crecimiento tumoral en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, donde se inhibe el crecimiento tumoral.

14. Un método de tratamiento del tumor, cáncer o trastorno de proliferación celular en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1, donde se trata el tumor, cáncer o trastorno de proliferación celular.

15. El método de la reivindicación 13 ó 14, donde el tumor, cáncer o trastorno de proliferación celular es carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma o leucemia.

16. El método de la reivindicación 13 ó 14, que comprende, además, la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico.

17. El método de la reivindicación 16, donde el agente antiangiogénico es un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

18. El método de la reivindicación 17, donde el antagonista del VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.

19. El método de la reivindicación 18, donde el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

20. Un método para mejorar la eficacia de un agente antiangiogénico en un sujeto con un proceso patológico asociado con la angiogénesis, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista de ALK-1 en combinación con el agente antiangiogénico, lo que permite aumentar la actividad inhibidora de dicho agente antiangiogénico.

21. El método de la reivindicación 20, donde el proceso patológico asociado con la angiogénesis es un tumor, un cáncer o un trastorno de proliferación celular.

22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, donde el antagonista del ALK-1 es una inmunoadhesina de ALK-1.

23. El método de la reivindicación 22, donde la inmunoadhesina ALK-1 comprende residuos de aminoácidos 22-352 del identificador de secuencia n.º: 2, residuos 22-349 del identificador de secuencia n.º: 4, residuos 22-347 del identificador de secuencia n.º: 6, residuos 22-350 del identificador de secuencia n.º: 8 o residuos 22-350 del identificador de secuencia n.º: 10.

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, donde el antagonista de ALK-1 es un anticuerpo anti-ALK-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

25. Un antagonista de ALK-1 para su uso en la prevención, inhibición o tratamiento de la metástasis del tumor o para el tratamiento del tumor, del cáncer o del trastorno de proliferación celular.

26. El antagonista de ALK-1 de la reivindicación 25, donde el antagonista de ALK-1 es una inmunoadhesina ALK-1.

27. El antagonista de ALK-1 de la reivindicación 26, donde la inmunoadhesina ALK-1 comprende residuos de aminoácidos 22-352 del identificador de secuencia n.º: 2, residuos 22-349 del identificador de secuencia n.º: 4, residuos 22-347 del identificador de secuencia n.º: 6, residuos 22-350 del identificador de secuencia n.º: 8 o residuos 22-350 del identificador de secuencia n.º: 10.

28. El antagonista de ALK-1 de la reivindicación 25, donde el antagonista de ALK-1 es un anticuerpo anti-ALK-1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

ALK1.Fc

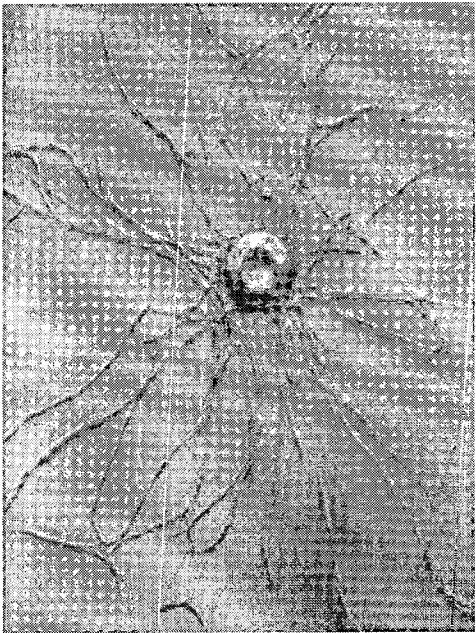


FIG. 1B

Control

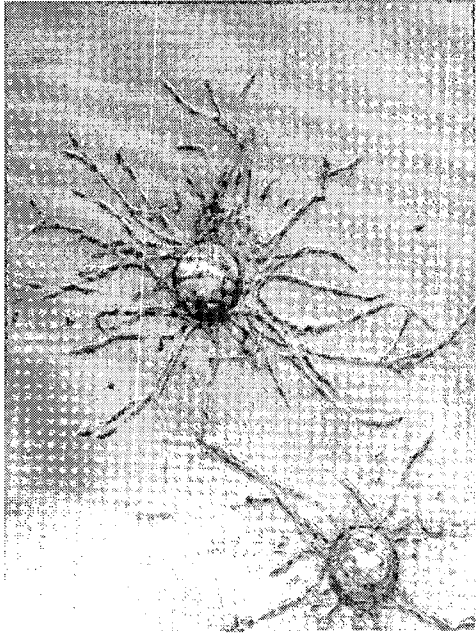


FIG. 1A

130

FIG. 2A

Lecitina-FITC

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

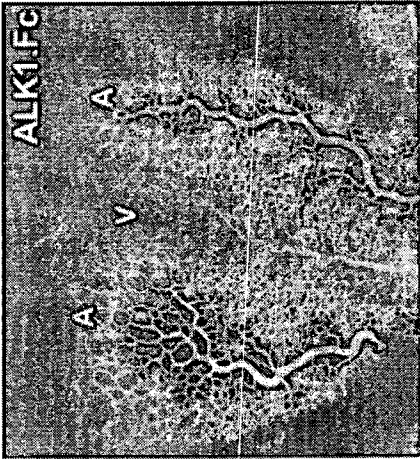


FIG. 2B

CD31 + Lecitina-FITC

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

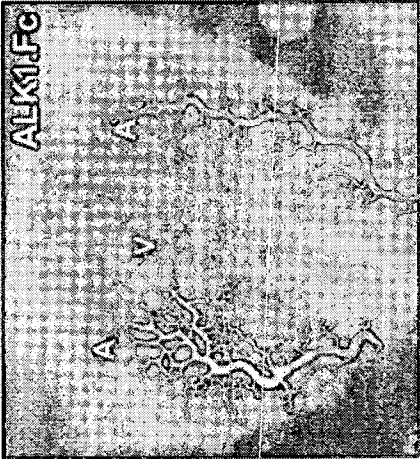
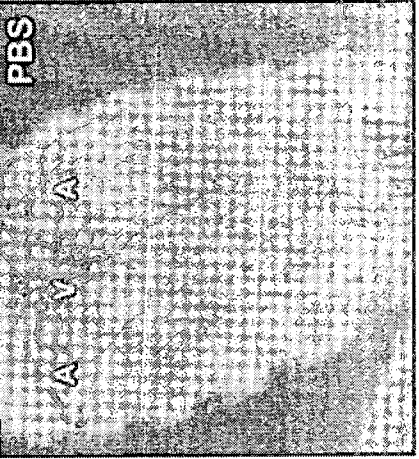
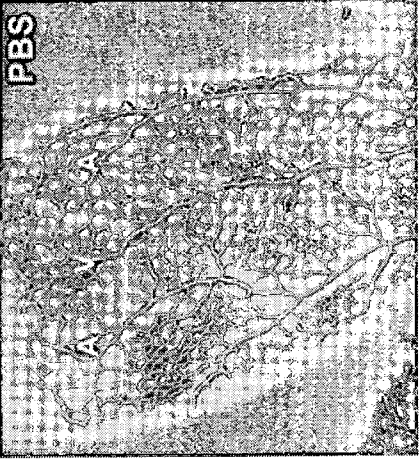
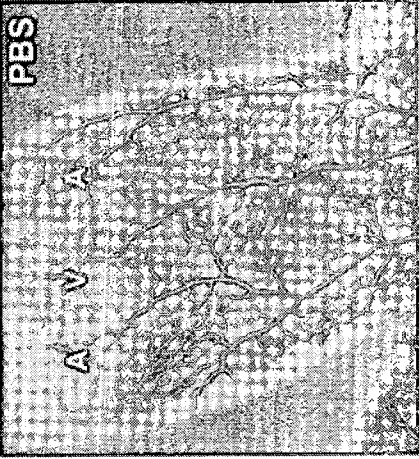
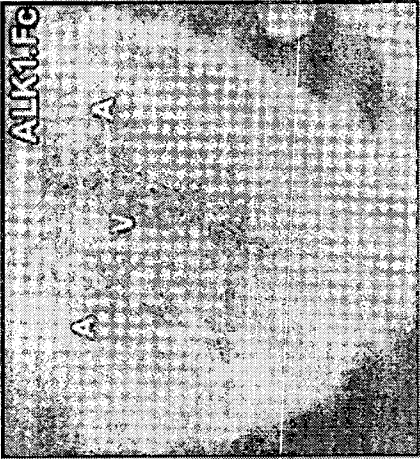


FIG. 2C

CD31

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)



Lecitina-FITC

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

CD31 + Lecitina-FITC

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

CD31

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

FIG. 2D

FIG. 2E

FIG. 2F

132

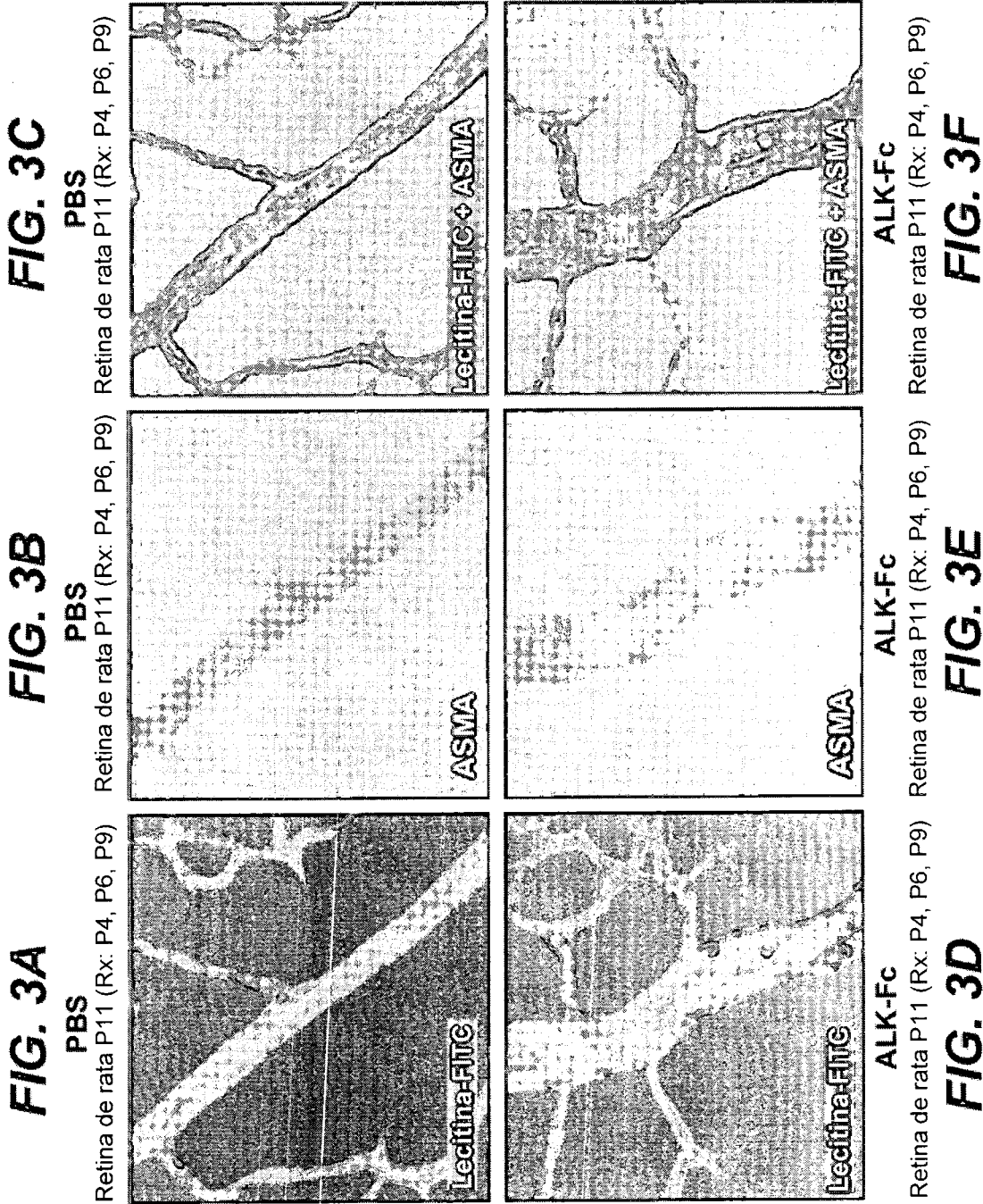


FIG. 4A

58
59
60

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

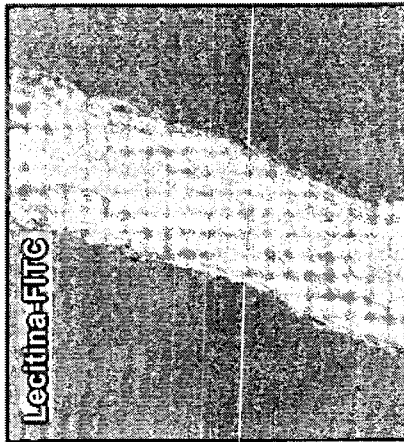


FIG. 4B

**S
B
D**

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

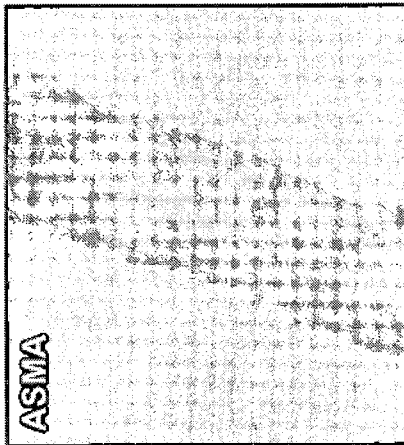
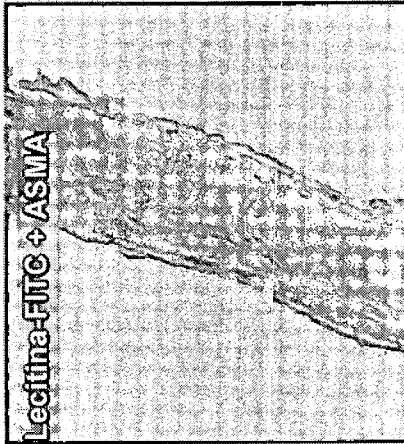


FIG. 4C

500

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)



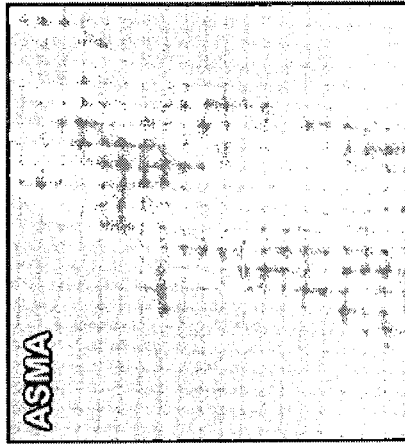
ALK-FC

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)



ALK-FC

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)



ALK-Fc

Retina de rata P11 (Rx: P4, P6, P9)

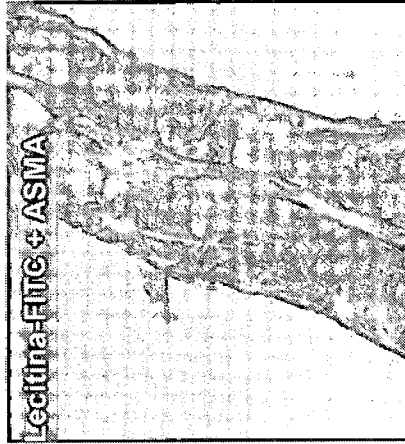


FIG. 4D

FIG. 4E

FIG. 4F

133

P4042R1

5 / 13

ALK1.Fc Inhibe el crecimiento tumoral

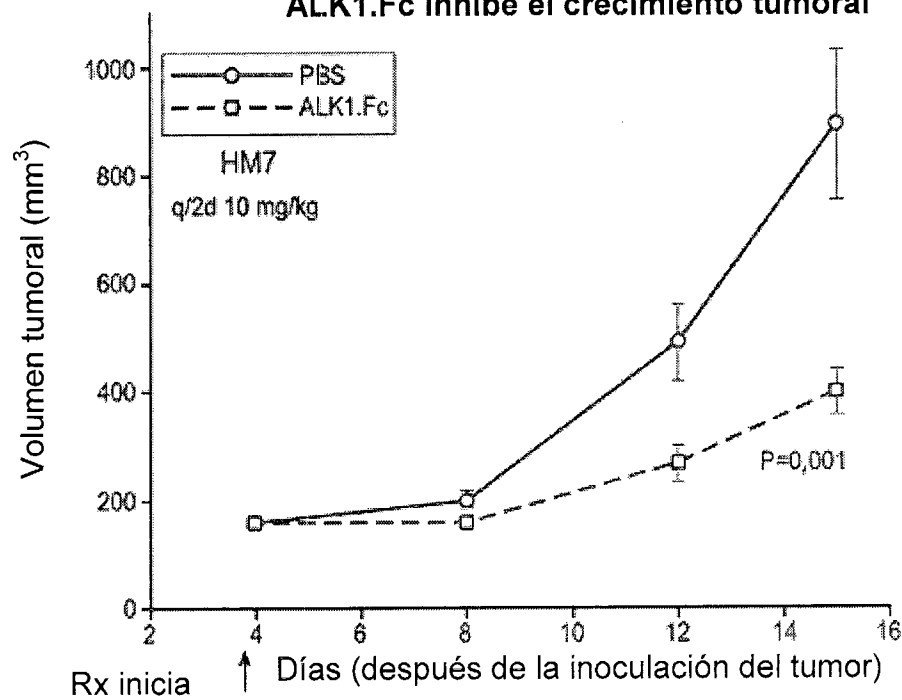


FIG. 5A

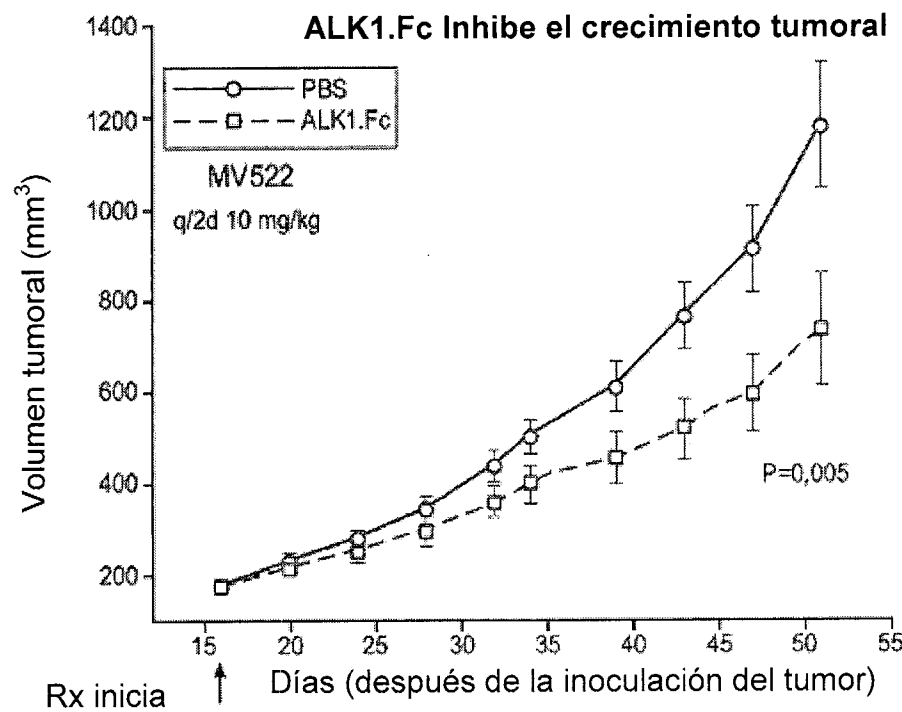


FIG. 5B

6 / 13

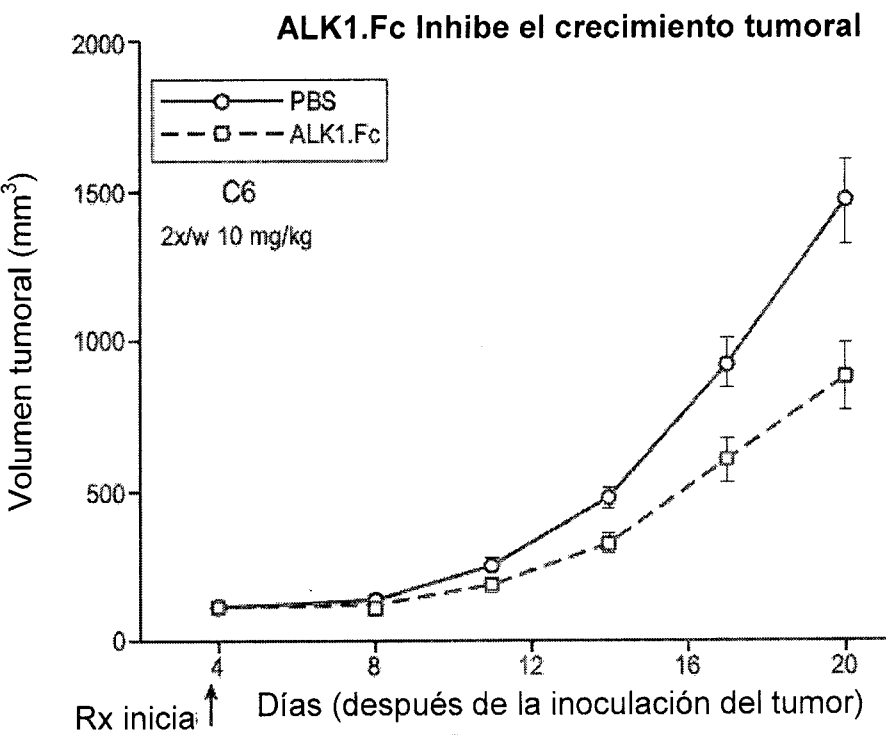


FIG. 6A

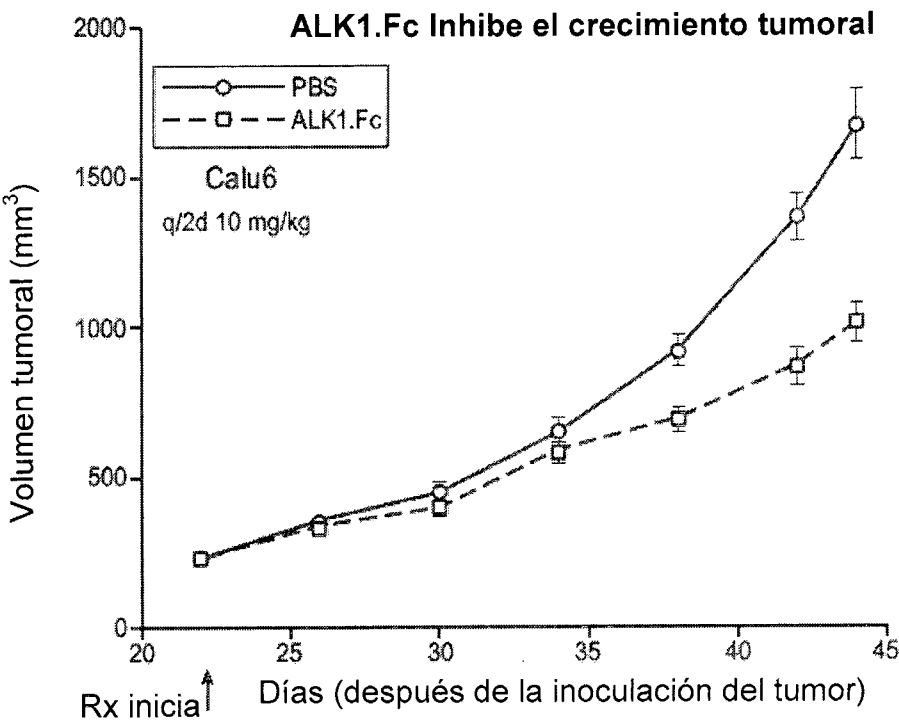


FIG. 6B

P4042R1

7 / 13

ALK1.Fc tiene actividad anti-tumoral aditiva en combinación con el anti-VEGF

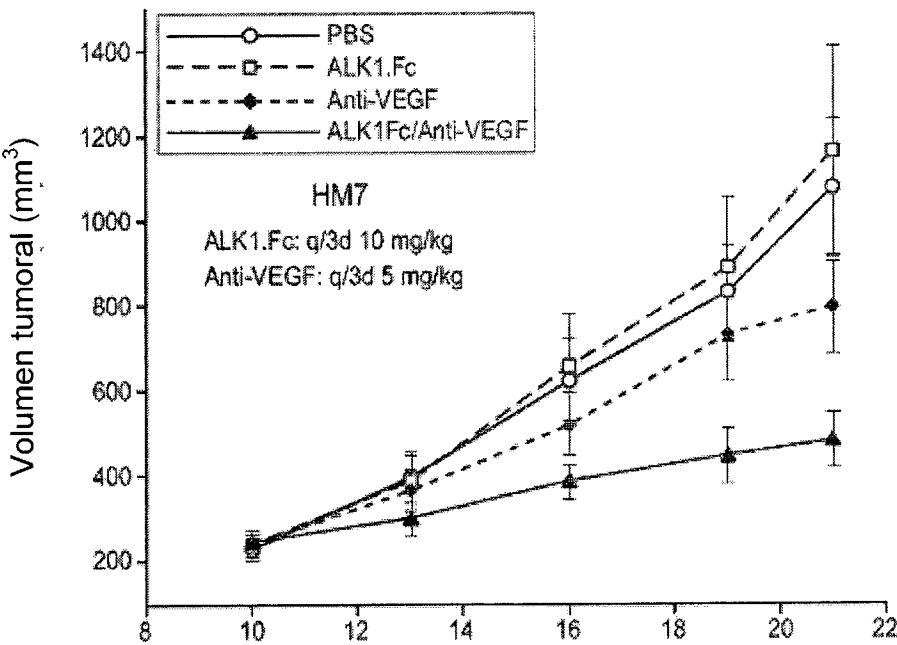


FIG. 7 Rx inicia ↑ Días (después de la inoculación del tumor)

ALK1.Fc tiene actividad anti-tumoral aditiva en combinación con el anti-VEGF

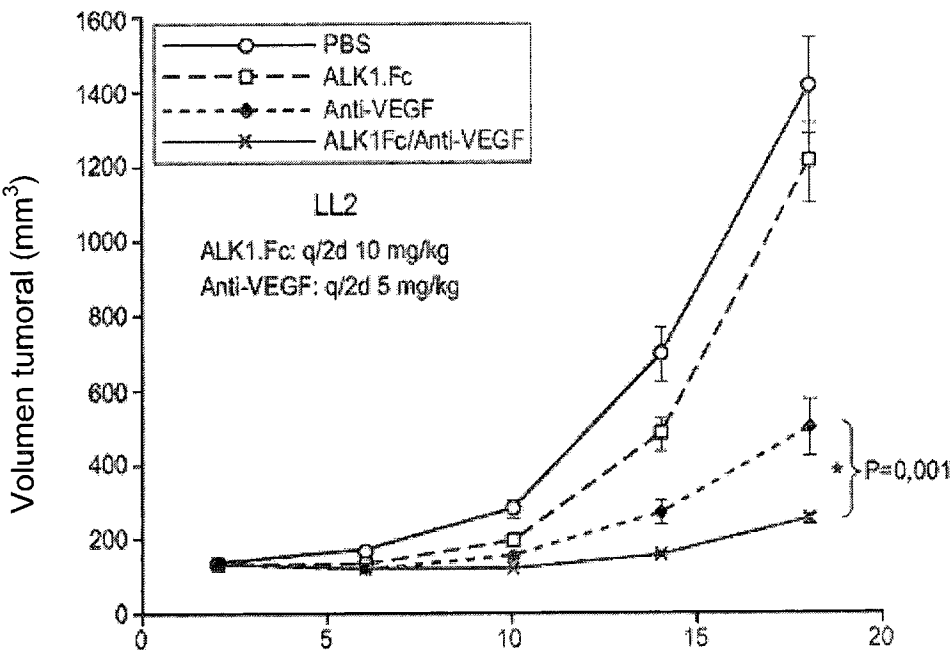


FIG. 8 Días

La combinación de ALK1.Fc con anti-VEGF causa una reducción marcada en la densidad vascular del tumor

FIG. 9A

LL2

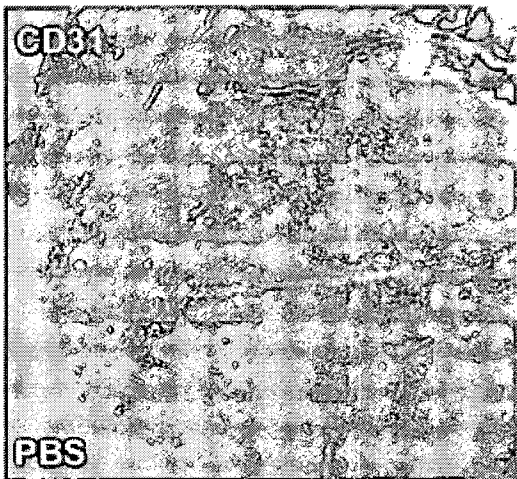
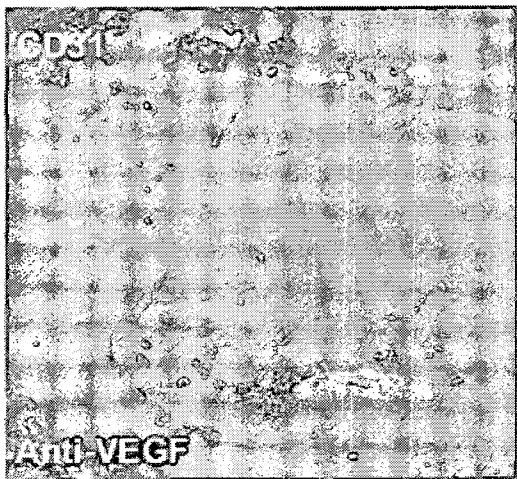
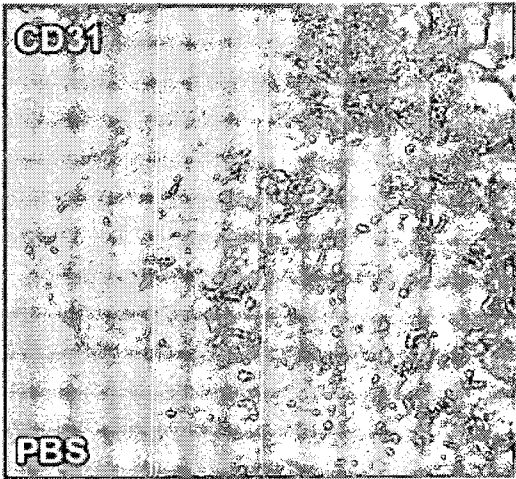


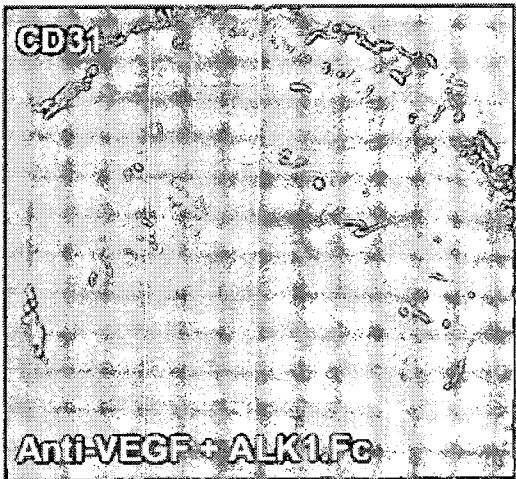
FIG. 9B

LL2



LL2

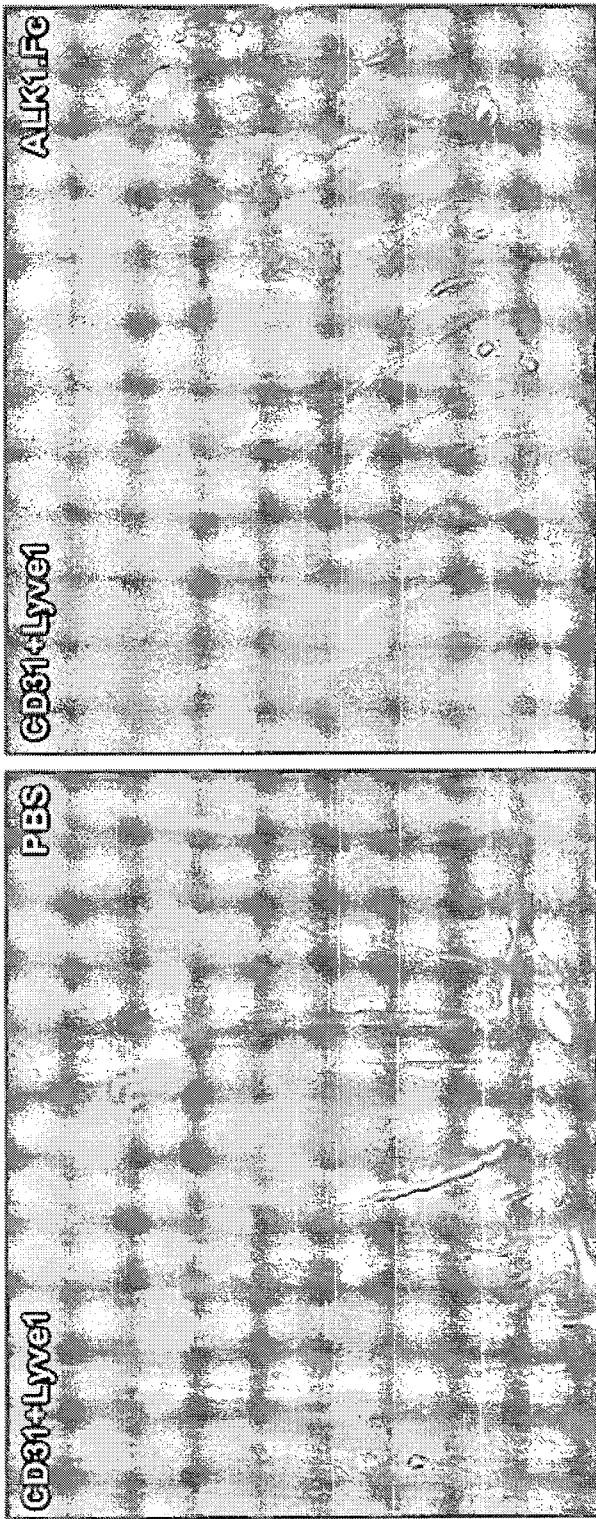
FIG. 9C



LL2

FIG. 9D

La ALK1.Fc afecta el desarrollo de los capilares linfáticos en los vellos intestinales de ratón en la etapa postnatal temprana



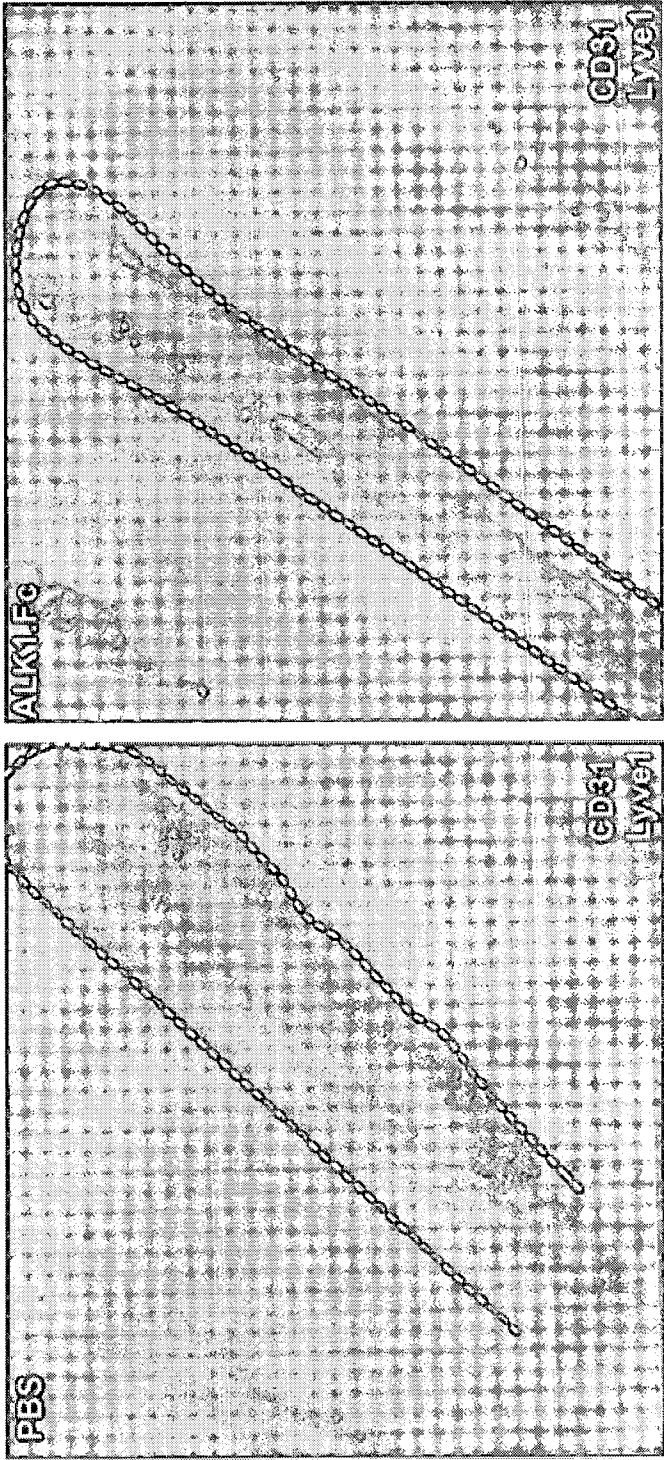
Intestino delgado de ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)

FIG. 10A

Intestino delgado de ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)

FIG. 10B

La ALK1.Fc afecta el desarrollo de los capilares linfáticos en los vellos intestinales de ratón en la etapa postnatal temprana



Intestino delgado de ratón P9
Rx: P1, P3 y IP6 (10mg/ml)

FIG. 11B

Intestino delgado de ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)

FIG. 11A

ALK1.Fc afecta el desarrollo de la vasculatura linfática de la piel de la cola del ratón en la etapa postnatal temprana

FIG. 12A

Piel de la cola de ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)

PBS

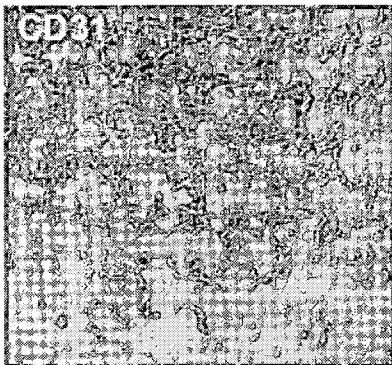


FIG. 12B

Piel de la cola de ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)

PBS

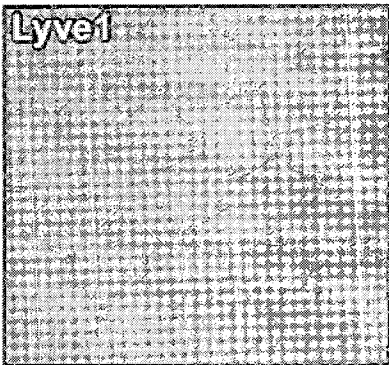
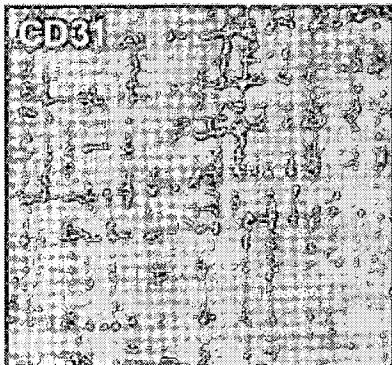
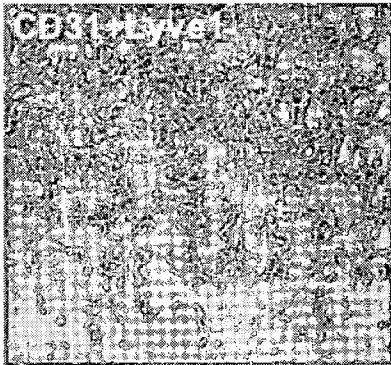


FIG. 12C

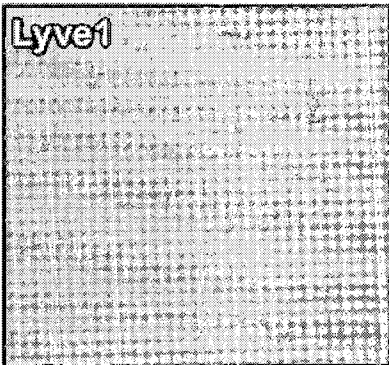
Piel de la cola de ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)

PBS



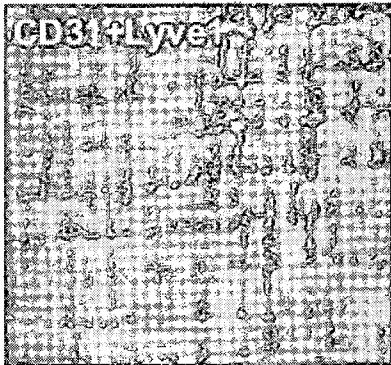
ALK1.Fc

Piel de la cola de ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)



ALK1.Fc

Piel de la cola de ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)



ALK1.Fc

Piel de la cola de ratón P9
Rx: P1, P3 y P6 (10mg/ml)

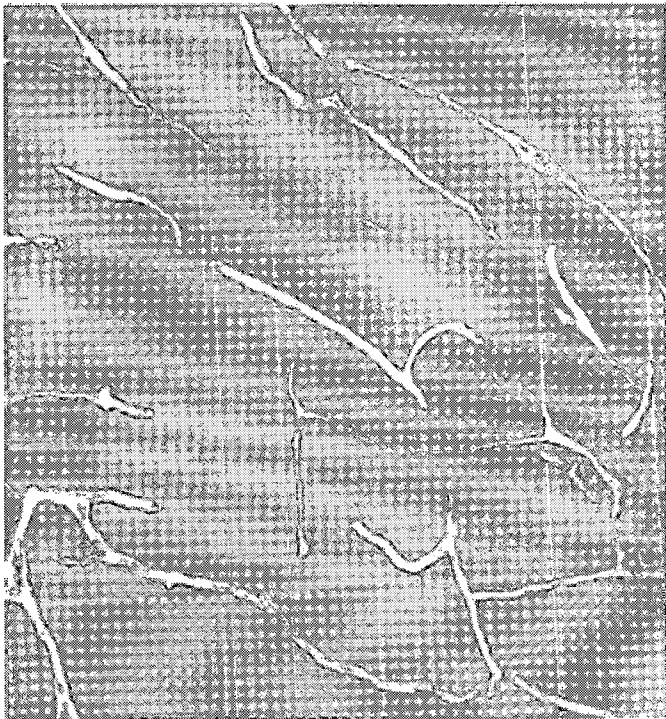
FIG. 12D

FIG. 12E

FIG. 12F

ALK1. Los vasos del tumor tratado con Fc presentan pericitos sueltos y mal organizados

Control



Meca32+CD105+Desmin
TIB68

FIG. 13A

ALK1.Fc

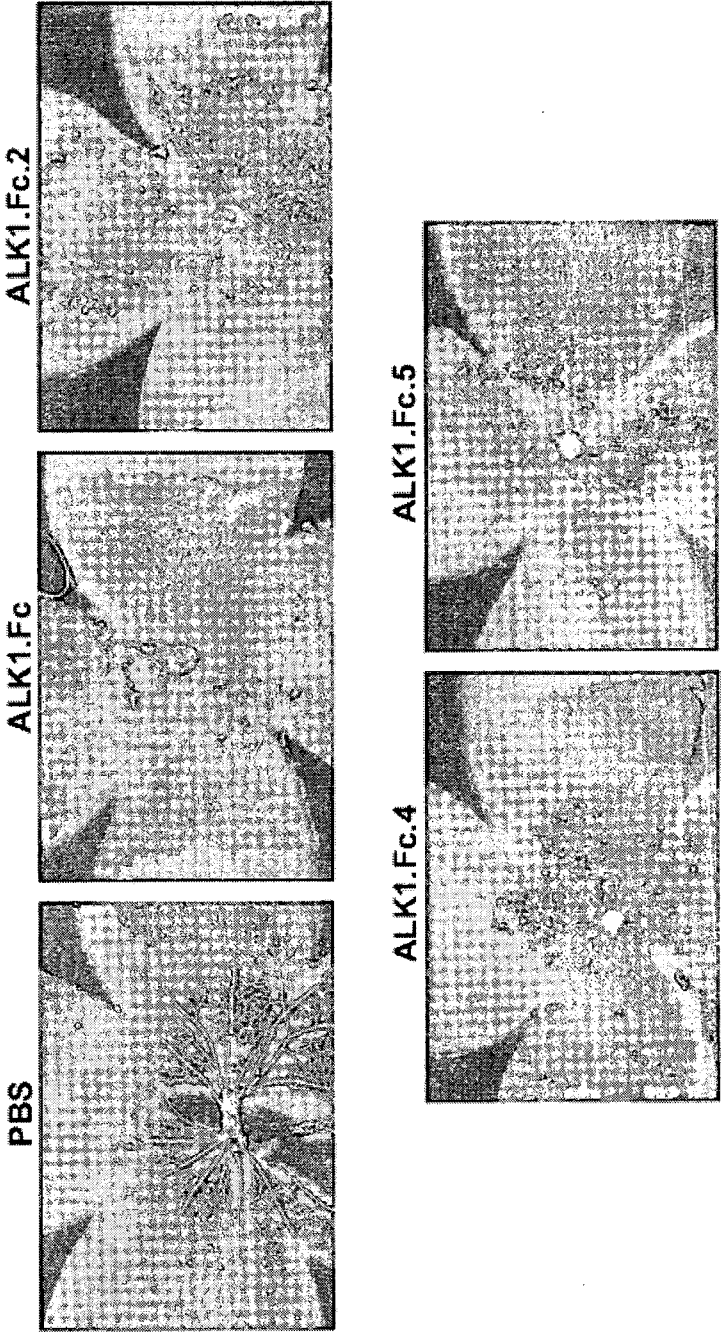


Meca32+CD105+Desmin
TIB68

FIG. 13B

140

Las inmunoadhesinas de ALK-1 afectan el desarrollo vascular de la retina de ratones recién nacidos



Retina de ratón P8 (Rx: P4, P6) tinción con CD31

FIG. 14

<110> Yan, Minhong
 <120> COMPOSICIONES MÉTODOS DE USO DE LA QUINASA-1 SIMILAR AL RECEPTOR DE LA ACTIVINA
 <130> P4042R1
 <150> Patente de EE.UU. n.º 60/986.876
 <151> 2007-11-09
 <150> Patente de EE.UU. n.º 61/098.557
 <151> 2008-09-19
 <160> 10
 <210> 1
 <211> 1059
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> se sintetiza la secuencia

<400> 1
 atgaccttgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt 50
 ggtgacccag ggagaccctg tgaagccgtc tcggggcccg ctggtgacct 100
 gcacgtgtga gagccacat tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg 150
 tgcacagtag tgctggtgcg ggaggagggg aggcaccccc aggaacatcg 200
 gggctgcggg aacttgaca gggagctctg cagggggcgc cccaccgagt 250
 tcgtcaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caacgtgtcc 300
 ctggtgctgg agggcaccca acctccttcg gagcagccgg gaacagatgg 350
 ccagaccggt gtcaccgaca aagctgcgca ctatactctg tgcccaccgt 400
 gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttccccca 450
 aaacccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacatgcgt 500
 ggtggtggcc gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg 550
 tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 600
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga 650
 ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc 700
 cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 750
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gaagagatga ccaagaacca 800
 ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg 850
 tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 900
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt 950
 ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc 1000
 atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1050
 ggtaaata 1059

143

<211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> se sintetiza la secuencia

<400> 2
 Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Lys Gly Leu Leu Met Leu Leu Met
 1 5 10 15
 Ala Leu Val Thr Gln Gly Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro
 20 25 30
 Leu Val Thr Cys Thr Cys Glu Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr
 35 40 45
 Cys Arg Gly Ala Trp Cys Thr Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly
 50 55 60
 Arg His Pro Gln Glu His Arg Gly Cys Gly Asn Leu His Arg Glu
 65 70 75
 Leu Cys Arg Gly Arg Pro Thr Glu Phe Val Asn His Tyr Cys Cys
 80 85 90
 Asp Ser His Leu Cys Asn His Asn Val Ser Leu Val Leu Glu Ala
 95 100 105
 Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln Pro Gly Thr Asp Gly Gln Thr Gly
 110 115 120
 Val Thr Asp Lys Ala Ala His Tyr Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro
 125 130 135
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 140 145 150
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 155 160 165
 Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 170 175 180
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 185 190 195
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 200 205 210
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 215 220 225
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 230 235 240
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 245 250 255
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 260 265 270
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 275 280 285
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 290 295 300
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 305 310 315
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
335 340 345

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
350

<210> 3
<211> 1051
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> se sintetiza la secuencia

<400> 3
atgaccttgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt 50
ggtgaccag ggagaccctg tgaagccgtc tcggggcccg ctggtgacct 100
gcacgtgtga gagccacat tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg 150
tgcacagtag tgctggtgcg ggaggagggg aggcaccccc aggaacatcg 200
gggctgcggg aacttgaca gggagctctg cagggggcgc cccaccgagt 250
tcgtcaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caacgtgtcc 300
ctggtgctgg aggccacca acctccttcg gagcagccgg gaacagatgg 350
ccagaccggt gtcaccgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac 400
ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag 450
gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tgggtggtgga 500
cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg 550
tggagggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 600
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa 650
tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca 700
tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacagggtg 750
tacaccctgc ccccatcccg ggaagagatg accaagaacc aggtcagcct 800
gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg 850
agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 900
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag 950
caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc 1000
tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaata 1050
g 1051

<210> 4
<211> 349
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> se sintetiza la secuencia

<400> 4
Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Lys Gly Leu Leu Met Leu Leu Met
1 5 10 15

GENENLAW-#293468-v1-Spanish_translation_of_seq_listing_P4042R1_es-central_and_south_america.TX

Ala	Leu	Val	Thr	Gln	Gly	Asp	Pro	Val	Lys	Pro	Ser	Arg	Gly	Pro
				20					25					30
Leu	Val	Thr	Cys	Thr	Cys	Glu	Ser	Pro	His	Cys	Lys	Gly	Pro	Thr
				35					40					45
Cys	Arg	Gly	Ala	Trp	Cys	Thr	Val	Val	Leu	Val	Arg	Glu	Glu	Gly
				50					55					60
Arg	His	Pro	Gln	Glu	His	Arg	Gly	Cys	Gly	Asn	Leu	His	Arg	Glu
				65					70					75
Leu	Cys	Arg	Gly	Arg	Pro	Thr	Glu	Phe	Val	Asn	His	Tyr	Cys	Cys
				80					85					90
Asp	Ser	His	Leu	Cys	Asn	His	Asn	Val	Ser	Leu	Val	Leu	Glu	Ala
				95					100					105
Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Glu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Gly	Gln	Thr	Gly
				110					115					120
Val	Thr	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
				125					130					135
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
				140					145					150
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
				155					160					165
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
				170					175					180
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				185					190					195
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
				200					205					210
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
				215					220					225
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				230					235					240
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
				245					250					255
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
				260					265					270
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
				275					280					285
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
				290					295					300
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				305					310					315
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
				320					325					330
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
				335					340					345
Ser	Pro	Gly	Lys											

<210> 5
 <211> 1044

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> se sintetiza la secuencia

<400> 5
atgaccttgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt 50
ggtgacctag ggagacctg tgaagccgtc tcggggcccg ctggtgacct 100
gcacgtgtga gagcccacat tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg 150
tgcacagtag tgctggtgcg ggaggagggg aggcaccccc aggaacatcg 200
gggctgcggg aacttgaca gggagctctg cagggggcgc cccaccgagt 250
tcgtcaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caacgtgtcc 300
ctggtgctgg aggccacca acctccttcg gagcagccgg gaacagatgg 350
ccagaccggt gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac 400
tcctgggggg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 450
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggccgtgag 500
ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg 550
tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 600
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa 650
ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga 700
aaaccatctc caagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 750
ctgccccat cccgggaaga gatgaccaag aaccaggta gcctgacctg 800
cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca 850
atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 900
gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg 950
gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca 1000
accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atga 1044

<210> 6
<211> 347
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> se sintetiza la secuencia

<400> 6
Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Lys Gly Leu Leu Met Leu Leu Met
1 5 10 15
Ala Leu Val Thr Gln Gly Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro
20 25 30
Leu Val Thr Cys Thr Cys Glu Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr
35 40 45
Cys Arg Gly Ala Trp Cys Thr Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly
50 55 60
Arg His Pro Gln Glu His Arg Gly Cys Gly Asn Leu His Arg Glu
65 70 75
Página 5

Leu Cys Arg Gly Arg Pro Thr Glu Phe Val Asn His Tyr Cys Cys
80 85 90
Asp Ser His Leu Cys Asn His Asn Val Ser Leu Val Leu Glu Ala
95 100 105
Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln Pro Gly Thr Asp Gly Gln Thr Gly
110 115 120
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
125 130 135
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
140 145 150
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala
155 160 165
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
170 175 180
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
185 190 195
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
200 205 210
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
215 220 225
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
230 235 240
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
245 250 255
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
260 265 270
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
275 280 285
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
290 295 300
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305 310 315
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
320 325 330
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
335 340 345
Gly Lys

<210> 7
<211> 1053
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> se sintetiza la secuencia

<400> 7
atgaccttgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt 50
ggtgaccag ggagaccctg tgaagccgtc tcggggcccg ctggtgacct 100
gcacgtgtga gagccacat tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg 150
Página 6

108

tgcacagtag tgctggtgcg ggaggagggg aggcaccccc aggaacatcg 200
gggctgcggg aacttgaca gggagctctg cagggggcgc cccaccgagt 250
tcgtcaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caacgtgtcc 300
ctggtgctgg aggccacca acctccttcg gagcagccgg gaacagatgg 350
ccaggagccc aaatcttgtg acaaaactca cacatgccc ccggtgcccag 400
cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 450
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtggtggt 500
ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg 550
gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 600
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct 650
gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc 700
ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 750
gtgtacaccc tgccccatc ccgggaagag atgaccaaga accaggtcag 800
cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt 850
gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 900
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagetca ccgtggacaa 950
gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg 1000
ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1050
tga 1053

<210> 8
<211> 350
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> se sintetiza la secuencia

<400> 8
Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Lys Gly Leu Leu Met Leu Leu Met 15
1 5 10
Ala Leu Val Thr Gln Gly Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro 30
20 25 30
Leu Val Thr Cys Thr Cys Glu Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr 45
35 40 45
Cys Arg Gly Ala Trp Cys Thr Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly 60
50 55 60
Arg His Pro Gln Glu His Arg Gly Cys Gly Asn Leu His Arg Glu 75
65 70 75
Leu Cys Arg Gly Arg Pro Thr Glu Phe Val Asn His Tyr Cys Cys 90
80 85 90
Asp Ser His Leu Cys Asn His Asn Val Ser Leu Val Leu Glu Ala 105
95 100 105
Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln Pro Gly Thr Asp Gly Gln Glu Pro 120
110 115 120

GENENLAW-#293468-v1-Spanish_translation_of_seq_listing_P4042R1_es-central_and_south_america.TX

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
125 130 135

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
140 145 150

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
155 160 165

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
170 175 180

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
185 190 195

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
200 205 210

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
215 220 225

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
230 235 240

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
245 250 255

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
260 265 270

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
275 280 285

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
290 295 300

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
305 310 315

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
320 325 330

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
335 340 345

Leu Ser Pro Gly Lys
350

<210> 9
<211> 1054
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> se sintetiza la secuencia

<400> 9
atgaccttgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt 50
ggtgaccag ggagaccctg tgaagccgtc tcggggcccg ctggtgacct 100
gcacgtgtga gagccacat tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg 150
tgcacagtag tgctggtgcg ggaggagggg aggcaccccc aggaacatcg 200
gggctgcggg aacttgcaca gggagctctg cagggggcgc cccaccgagt 250
tcgtcaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caacgtgtcc 300
ctggtgctgg aggccacca acctccttcg gagcagccgg gaacagatgg 350
ccaggagccc aaatcttctg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag 400

150

cacctgaact cctgggggga ccgtcagttt tcctcttccc cccaaaaccc 450
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtggtggt 500
ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg 550
gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 600
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct 650
gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc 700
ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 750
gtgtacaccc tgccccatc ccgggaagag atgaccaaga accaggtcag 800
cctgacctgc ctggtcaaag gtttctatcc cagcgacatc gccgtggagt 850
gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 900
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa 950
gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg 1000
ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1050
tgag 1054

<210> 10
<211> 350
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> se sintetiza la secuencia

<400> 10
Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Lys Gly Leu Leu Met Leu Leu Met 15
1 5 10
Ala Leu Val Thr Gln Gly Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro 30
20 25 30
Leu Val Thr Cys Thr Cys Glu Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr 45
35 40 45
Cys Arg Gly Ala Trp Cys Thr Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly 60
50 55 60
Arg His Pro Gln Glu His Arg Gly Cys Gly Asn Leu His Arg Glu 75
65 70 75
Leu Cys Arg Gly Arg Pro Thr Glu Phe Val Asn His Tyr Cys Cys 90
80 85 90
Asp Ser His Leu Cys Asn His Asn Val Ser Leu Val Leu Glu Ala 105
95 100 105
Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln Pro Gly Thr Asp Gly Gln Glu Pro 120
110 115 120
Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 135
125 130 135
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro 150
140 145 150
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val 165
155 160 165
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
Página 9

GENENLAW-#293468-v1-Spanish_translation_of_seq_listing_P4042R1_es-central_and_south_america.TX
170 175 180

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
185 190 195
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
200 205 210
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
215 220 225
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
230 235 240
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
245 250 255
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
260 265 270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
275 280 285
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
290 295 300
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
305 310 315
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
320 325 330
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
335 340 345
Leu Ser Pro Gly Lys
350

152

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

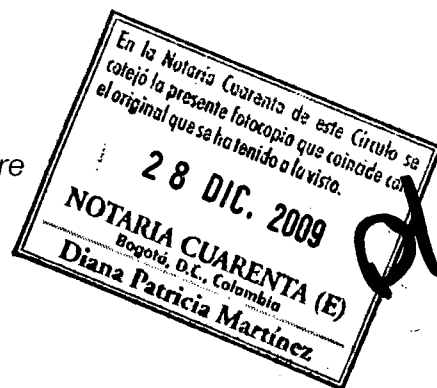
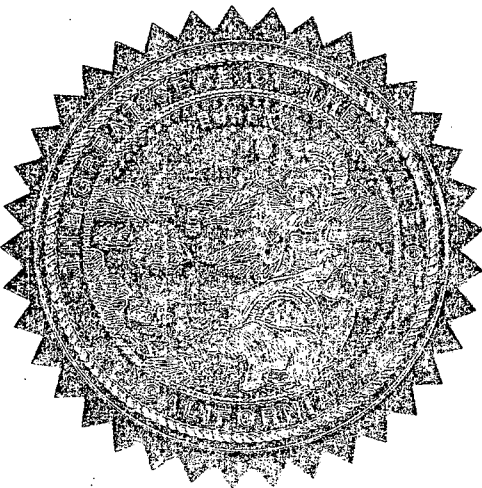
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 15th day of December 2005
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 267083
9. Seal/Stamp:

10. Signature



[Signature]

Secretary of State

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

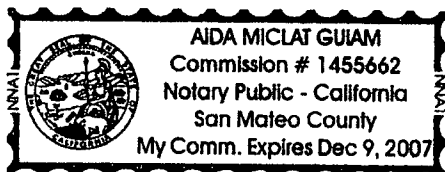
County of San Mateo } ss.

On December 6, 2005 before me, Aida Micala Guian

personally appeared Timothy R. Schwartz

☐ personally known to me
☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

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.

Aida Micala Guian
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____ Number of Pages: _____

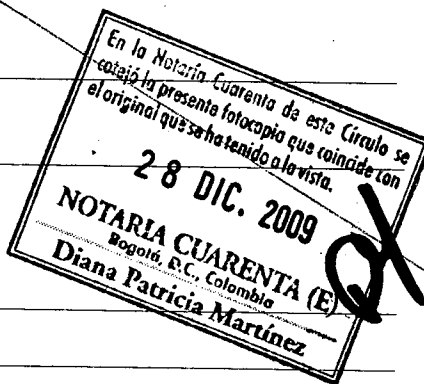
Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
- ☐ Corporate Officer — Title(s): _____
- ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
- ☐ Attorney-in-Fact
- ☐ Trustee
- ☐ Guardian or Conservator
- ☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____



Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

154

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseññas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurrir ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990**
USA

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

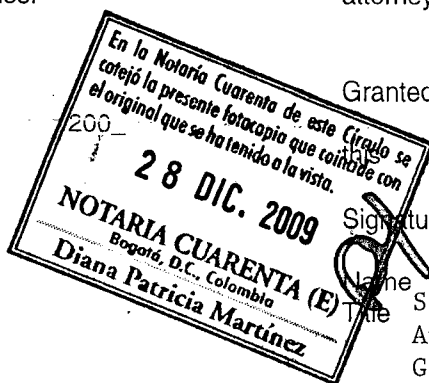
Granted and signed in

South San Francisco, California
USA

6th day of December 2005

Signature

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Section Patent Counsel
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.



155

AUTHORIZATION

Genentech, Inc. hereby authorizes any of Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec and Timothy R. Schwartz, for so long as they remain employees of Genentech, Inc., to execute, on its behalf, any submissions associated with the filing, prosecution, granting, and extension and maintenance of grant of patent and trademark applications in the U.S. and foreign countries, contracts relating to biological deposits with the American Type Culture Collection, and assignments to publishers of copyrights covering works authored by Genentech employees.

August 27, 2002

Dated

Sean Johnston

Sean A. Johnston
Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.



156

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **Genentech, Inc.** domiciliada en **1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, Estados Unidos de América.**

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Esta documento público
2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público
Estado de California

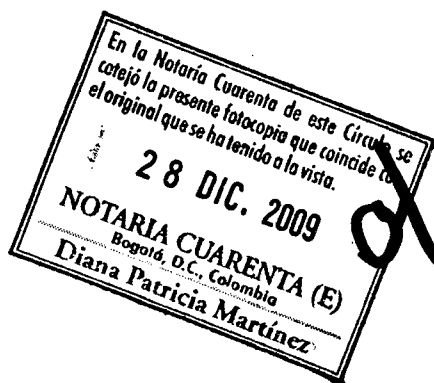
CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el 15 de diciembre de 2005
7. por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
8. No. 267083
9. Sello/Timbre

10. Firma

(Firma)

Secretario de Estado



RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El 6 de diciembre de 2005, ante mi, AIDA MICLAT GUIAM, apareció personalmente
Thimoty R. Schwartz

- ☐ a quien conozco personalmente
- ☒ quien demostró ante mi en base a evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre esta suscrito en el instrumento y quien reconoció ante mi que ejecutó el mismo en su capacidad autorizada, y que por su firma en el instrumento la persona o la entidad a nombre de la cual la persona actuó, ejecutó el instrumento.

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISIÓN # 14556612
Notario Público-California
Condado de San Mateo
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

-----OPCIONAL-----
Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede prevenir la remoción y readhesión fraudulenta de esta forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

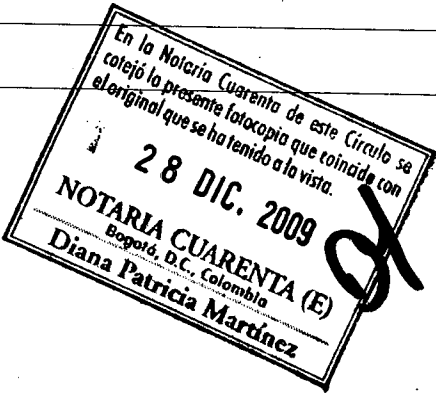
Título o tipo de documento: _____
Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____
Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba: _____

Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

- Nombre del firmante: _____
- ☐ Individuo
- ☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____
- ☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
- ☐ Abogado de hecho
- ☐ Fideicomisario
- ☐ Guardián o conservador
- ☐ Otro: _____

El firmante representa: _____

Huella Índice derecho del firmante
Parte alta del dedo aquí



AUTORIZACION

Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec y Thomity R. Schwartz, mientras permanezcan como empleados de Genentech, Inc., a ejecutar, a su nombre, cualquier solicitud asociada con presentación, procesamiento, consecución, y extensión y mantenimiento de concesión de solicitudes de patente y marca registrada en los Estados Unidos y países extranjeros, contratos relacionados con depósitos biológicos con la Colección Americana de Tipo de Cultivo, y cesiones a publicistas de derechos de autor que cubran los trabajos de autoría de los empleados de Genentech.

27 de Agosto de 2002
Fechado

(Firma)
Sean A. Johnston
Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.
28 DIC. 2009
NOTARIA CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Diana Patricia Martínez

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

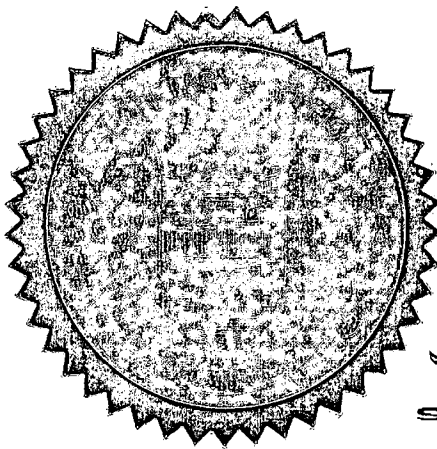
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254030

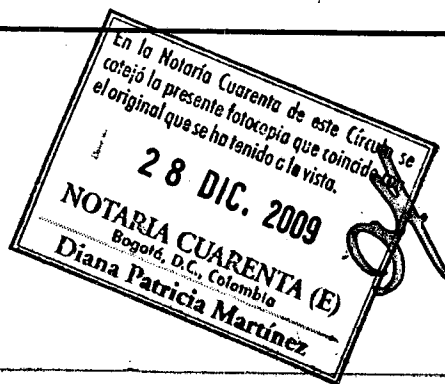
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



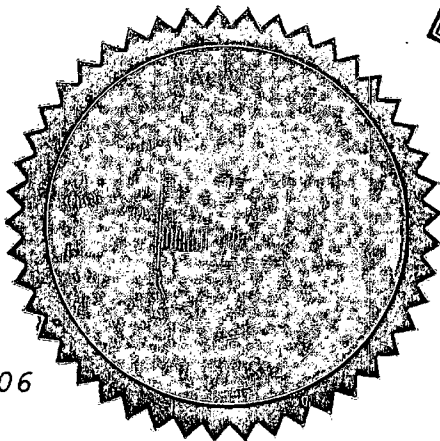
Delaware

PAGE 1

160

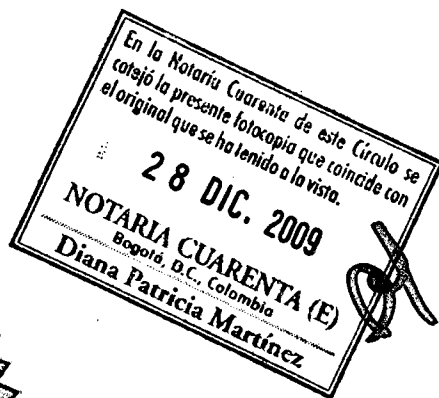
The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900384

DATE: 05-24-05

161

AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "Corporation"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

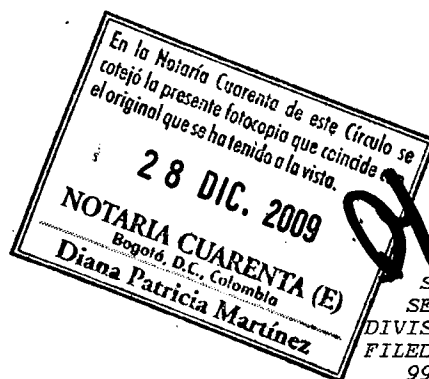
The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("Delaware Law").



STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
991302331 - 2112549

ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

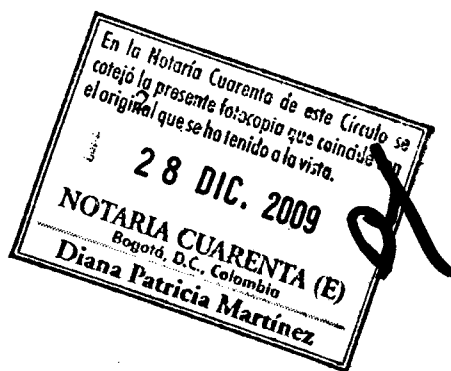
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of



163

the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

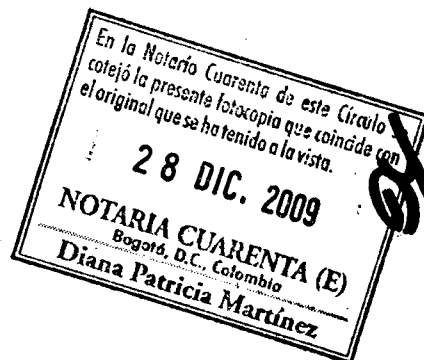
(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.



ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are

4

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.

28 DIC. 2009

NOTARIA CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Diana Patricia Martínez

165

divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

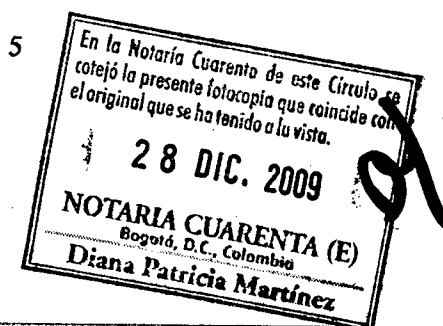
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors.* (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or



166

not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, rescission, adoption or modification.

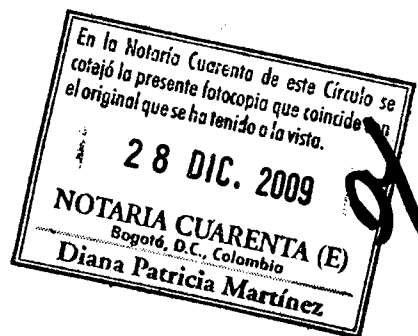
ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities

6



167
of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

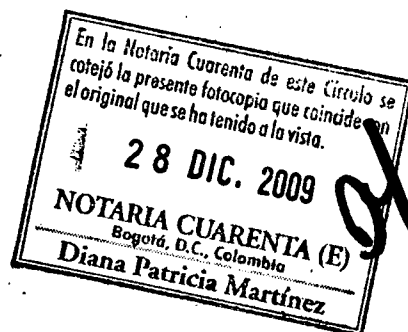
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.



168

SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

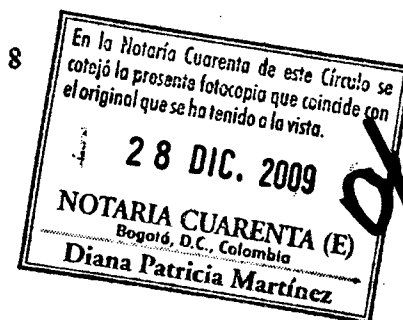
SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term "Roche" shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are "affiliates" (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination: Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the



169

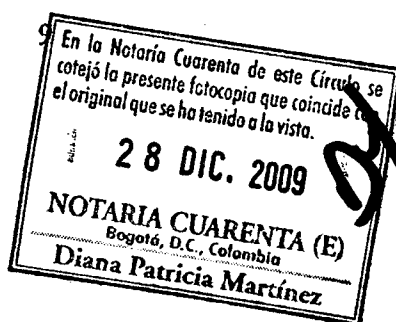
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "Corporation" and "Roche" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer or director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

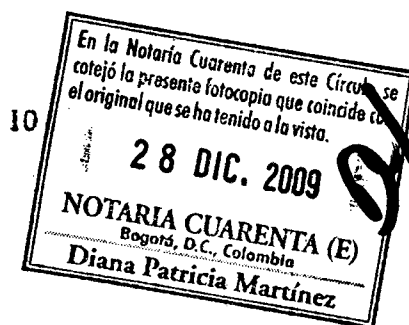
SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.



SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.

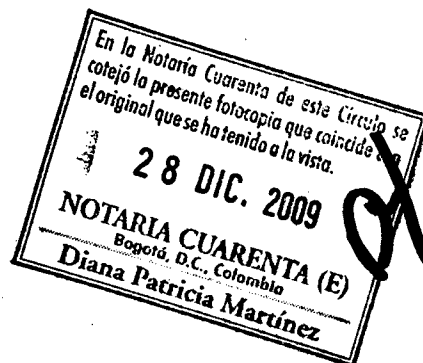


1571

IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



APOSTILLA

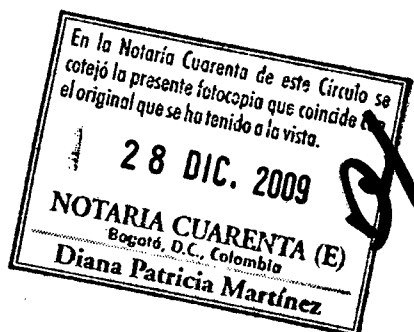
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254030
9. Sello/timbre
10. Firma

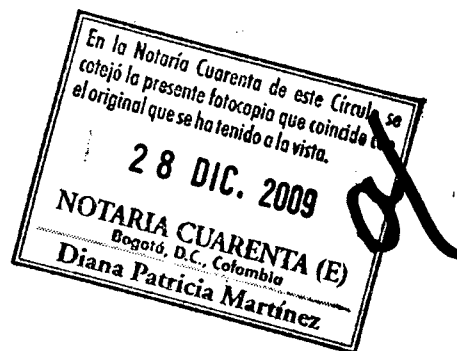
Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



193

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA MAÑANA.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900384

FECHA: 05 - 24 - 05

CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
GENENTECH, INC.

Genentech, Inc (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 23 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

Por la presente se vuelve a redactar el certificado de incorporación de la Corporación y se corrige aun más para que diga en su totalidad lo que sigue:

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

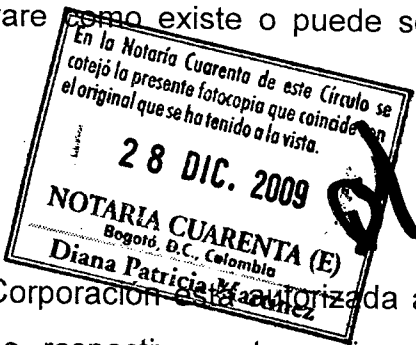
La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de a Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como existe o puede se modificada la misma en adelante ("**Delaware Law**").

ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación esta autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones



195
preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

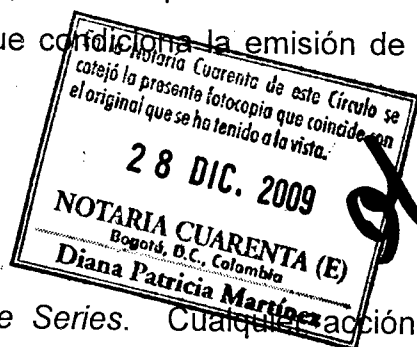
(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro del las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

(b) *Dividendos.* Sujeto a los derechos de los accionistas de las Acciones Preferenciales, los accionistas de Acciones Comunes deberán tener el derecho a recibir, cuando y como se declare por la Junta Directiva, de los activos de la Corporación los cuales están disponibles para ello por ley, dividendos pagables ya sea en dinero, propiedad, o acciones y los accionistas de la Acción Preferencial no tendrán derecho a participar en tales dividendos (a menos que la Junta Directiva determine lo contrario en cualquier resolución que condicione la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Serie y Límites de Variaciones entre Series.* Cualquier acción no emitida o del tesoro de las Acciones Preferenciales puede emitirse cada cierto tiempo en una o más series para tal consideración como pueda ser fijada cada cierto tiempo por la Junta Directiva. Antes de que se emita cualquier acción de las Acciones Preferenciales de cualquier serie particular, se deberá presentar un certificado ante el Secretario de Estado de Delaware estableciendo las designaciones, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones que irán anexas a las Acciones Preferenciales de tal serie y tales otras cuestiones como puedan requerirse, y la Junta Directiva deberá fijar y determinar, y por la presente está expresamente autorizada para fijar y determinar, en la forma provista por la ley, los



particulares de las acciones de tal serie (siempre y cuando no sean inconsistentes con las condiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes:

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, numero que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o reducida (pero no por debajo del número de acciones de las mismas que están vigentes) cada cierto tiempo por una acción semejante de la Junta Directiva;

(ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y le fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;

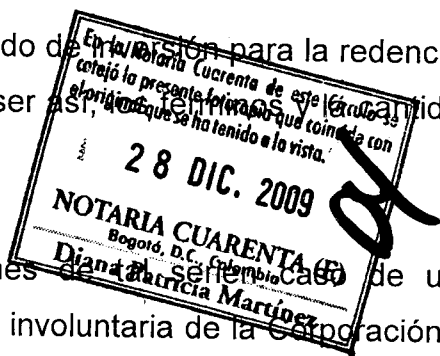
(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(iv) si tal serie tendrá o no privilegios de conversión y, de ser así, los términos y condiciones de tal conversión, incluyendo, pero sin estar limitado a, la condición para ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y de tal forma como la Junta Directiva lo determine;

(v) si las acciones de tal serie serán o no redimibles y, de ser así, los términos y condiciones de tal redención, incluyendo la fecha o fechas en las cuales o después de las cuales pueden ser redimibles, y la cantidad a pagar por acción en caso de redención, cantidad que variará bajo diferentes condiciones y en diferentes fechas de redención;

(vi) si tal serie tendrá o no un fondo de inversión para la redención o compra de acciones de esa serie y, de ser así, los términos y la cantidad de tal fondo de inversión;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de una liquidación, disolución o cierre voluntaria o involuntaria de la Corporación, y



los derechos relativos de prioridad, de haber, de pago de acciones de esa serie; y

(viii) cualquier otro derecho relativo, preferencia y limitación de tal serie.

ARTICULO 5

SECCION 5.01. *Enmiendas a los estatutos por los Directores.* (a) En adición y no limitando los poderes conferidos por estatutos, la Junta Directiva esta expresamente autorizada para hacer, alterar, enmendar, rechazar y rescindir los estatutos de la Corporación, sujetos a las secciones 5.01(b) y 5.01(c) a continuación.

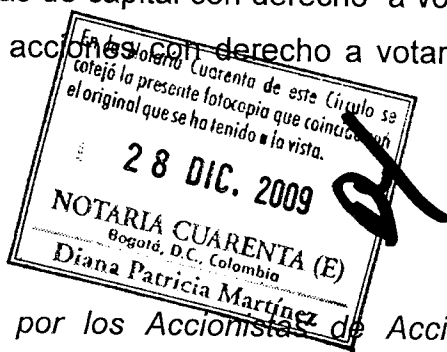
(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar las mismas.

SECCION 5.02. *Enmienda del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen a más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01(c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar la misma.

ARTICULO 6

SECCION 6.01. *Elección del Directorio por los Accionistas de Acción Preferencial.* Durante cualquier periodo cuando los accionistas de cualquier



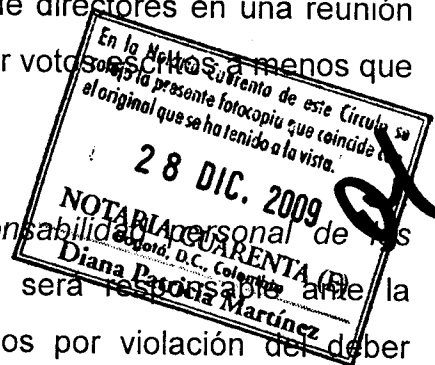
198

acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i) el número de directores autorizado de otro modo será incrementado por tal número de directores especificado, y los accionistas de tales Acciones Preferenciales o tales series de las mismas, que votan como una clase, tendrán derecho a elegir los directores adicionales para lo que se provee, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones Preferenciales o series; (ii) cada uno de tales directores adicionales servirá durante tal termino, y tendrá tales poderes de voto, como se han de otorgar en las provisiones pertinentes a tales Acciones Preferenciales o series; y (iii) siempre que los accionistas de cualquiera de tales Acciones Preferenciales o series de las mismas están desprovistos de tales derechos a elegir un número específico de directores, votando como clase, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones preferenciales o series, los términos de oficio de todos los directores elegidos por los accionistas de tales Acciones preferenciales o series, que votan como clase, de acuerdo con las condiciones o elegidos para llenar cualquier vacante resultante de la muerte, renuncia o remoción de directores así elegidos por los accionistas de tales Acciones Preferenciales o series, terminarán en adelante y el número autorizado de directores será reducido en concordancia.

SECCION 6.02. *Votaciones.* Las elecciones de directores en una reunión anual o especial de accionistas necesaria no serán por voto escrito a menos que los estatutos de la Corporación digan lo contrario.

SECCION 6.03. *Eliminación de cierta responsabilidad de los directores.* (a) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por daños monetarios por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo permita la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y sus herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quien fue o es una parte o esta amenazado de ser parte de, o esta involucrado en cualquier acción, demanda o proceso amenazado, pendiente, o completado, ya sea civil, criminal, administrativo o investigativo, por razón del hecho de que esa persona es o fue un director de la Corporación o es o estaba sirviendo por solicitud de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde lo



permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión cuna cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

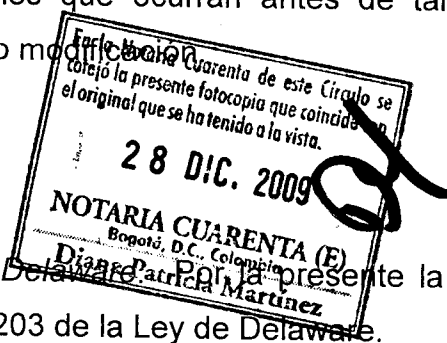
(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permite la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de tal alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.

ARTICULO 7

SECCION 7.01, Sección 203 de la Ley de Delaware. Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.



180

ARTICULO 8

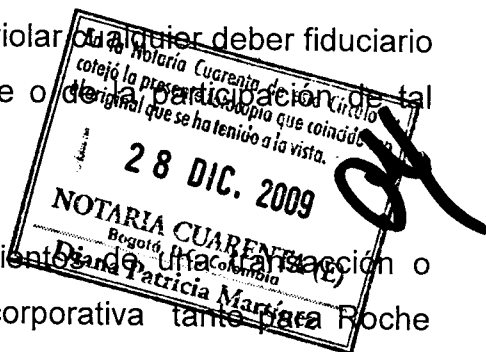
SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este artículos 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCION 8.02. *Actividades en Negocios Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito,

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o líneas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o director de la misma será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche o de la participación de tal persona en las mismas.

En el evento que Roche adquiriera conocimiento de una oportunidad o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hecho



que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiere algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha leído, noticiado o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 8.

En la Notaría Cuarenta y Seis, se ha presentado el original que coincide con el original que he retenido a la vista.
28 DIC. 2009
NOTARIA CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Diana Patricia Martínez

SECCION 8.05, *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término "**Roche**" debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son "**afiliados**" (como se

782

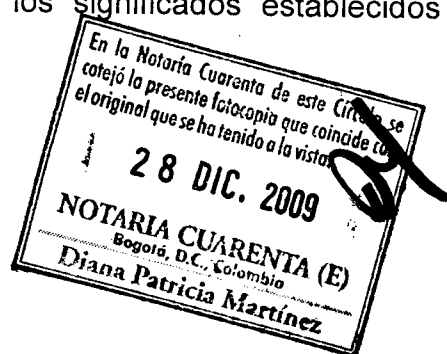
define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante*. Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9*. Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos*. Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "**Corporación**" y "**Roche**" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

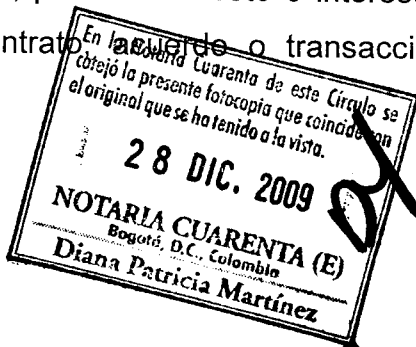


SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo). Las acciones vigentes de las Acciones Comunes de propiedad de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de accionistas que autorice o apruebe tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo).

SECCION 9.03. *No responsabilidad por acciones de buena fe.* Ni Roche ni ningún funcionario o director de la misma será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar cualquiera de los deberes fiduciarios o deberes de lealtad o por fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o por derivación de cualquier beneficio personal por razón del hecho que Roche o un funcionario o director de la misma de buena fe tome cualquier acción o ejerza cualquier derecho o de o retenga cualquier consentimiento en conexión con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto dado u otra acción tomada por cualquier persona que es un funcionario, director o representante de Roche, donde el voto o acción es tomado por tal persona en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho o un consentimiento de Roche para los propósitos de cualquiera de tal acuerdo o contrato.

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 9.

SECCION 9.05. *Contratos cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato ~~de~~ o transacción con la Corporación.



SECCION 9.06. *Efecto obligante.* Ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 9 ni la adopción de alguna condición inconsistente con cualquier condición de este Artículo 9 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 respecto a cualquier materia que ocurra, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, a no ser por este Artículo 9, pueda acaecer o surgir, antes de tal alteración, enmienda, cambio, rechazo o adopción.

SECCION 9.07. *Artículo 8.* Las condiciones de este Artículo 9 son adicionales a las condiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, el cual ha sido adoptado de acuerdo con las secciones 242 y 245 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware y por consentimiento escrito de el único accionista de la Corporación de acuerdo con la sección 228 de Ley General de Corporación del Estado de Delaware, ha sido ejecutado este 22 de Julio de 1999.

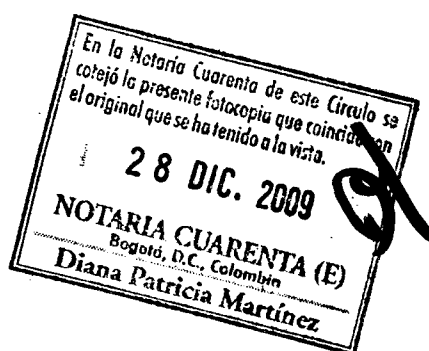
GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría



47.200
24
185

Apostille

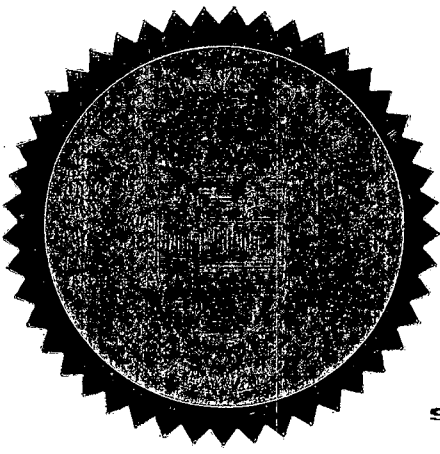
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254031

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

En la Notaria Cuarenta de este Circolo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.
28 DIC. 2009
NOTARIA CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Diana Patricia Martínez

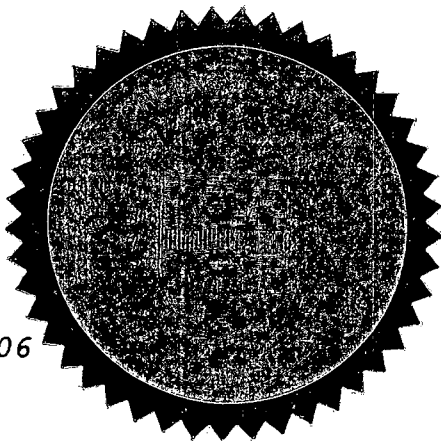
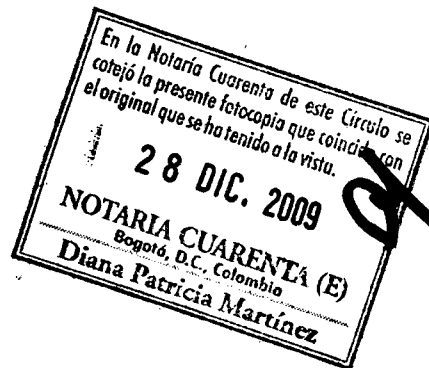
Delaware

PAGE 1

186

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

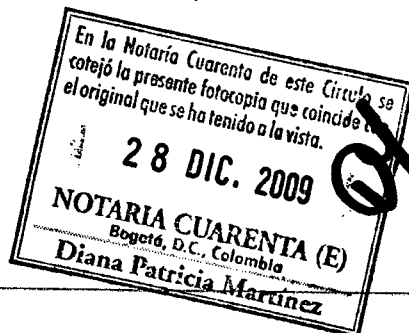
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

75841



APOSTILLA

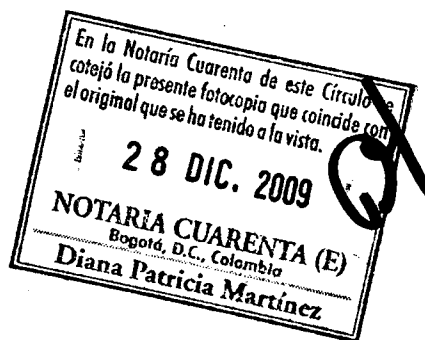
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254031
9. Sello/timbre
10. Firma

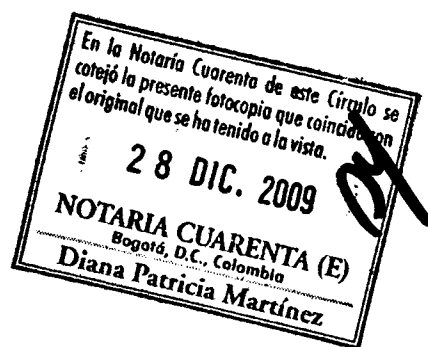
Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



189

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000, A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385

FECHA: 05 - 24 - 05

190

CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

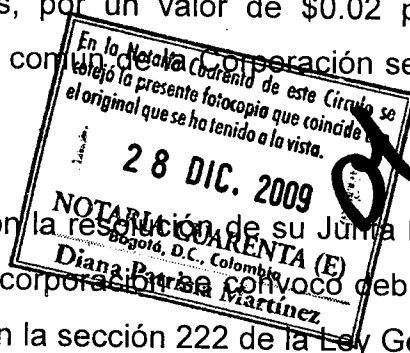
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

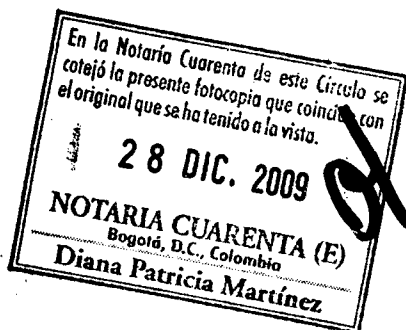
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

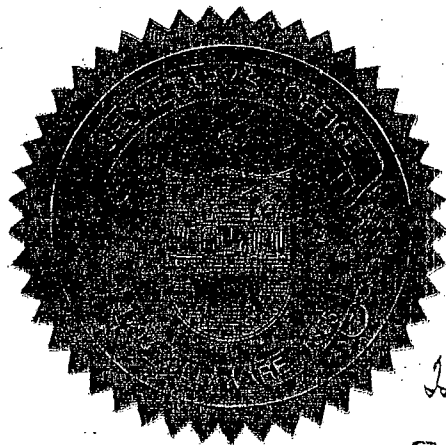
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254033

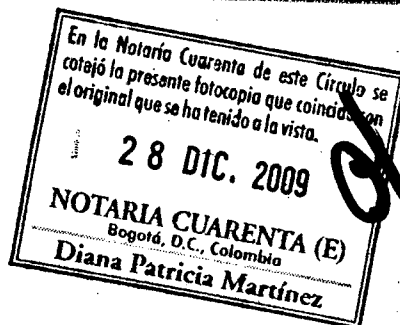
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



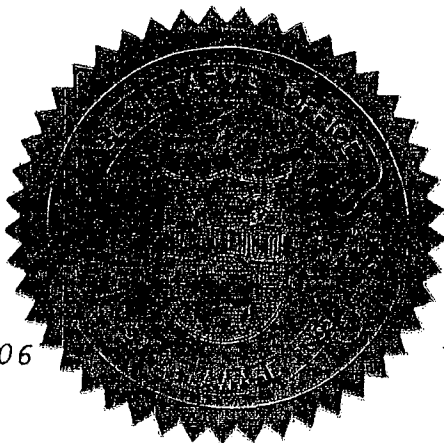
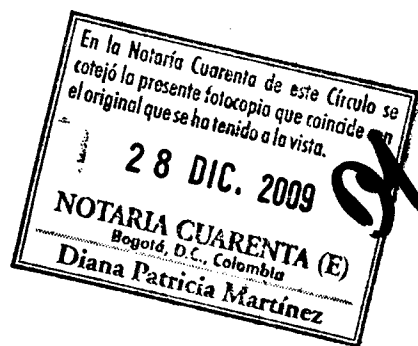
Delaware

PAGE 1

193

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

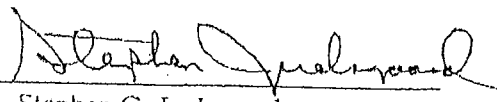
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

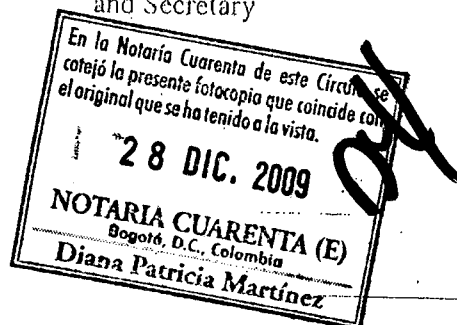
GENENTECH, INC.

By: 

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel
and Secretary

#153087



195

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

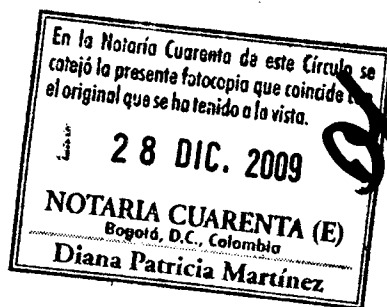
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
- Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre
10. Firma

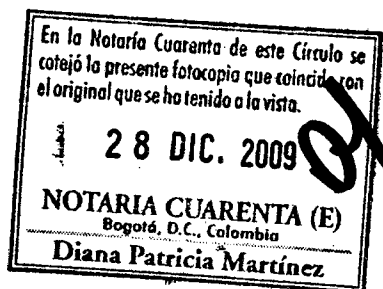
Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



196

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

1017

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

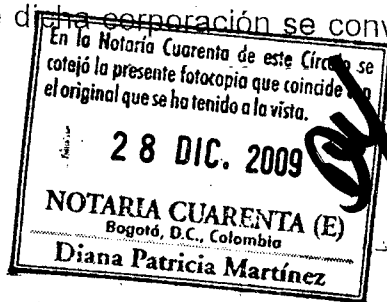
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente.



198

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

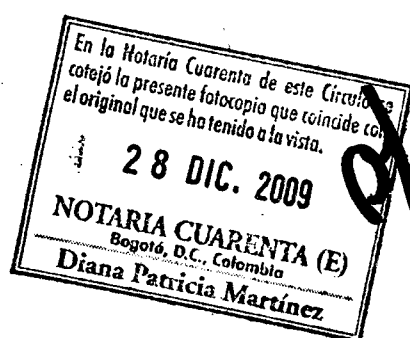
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

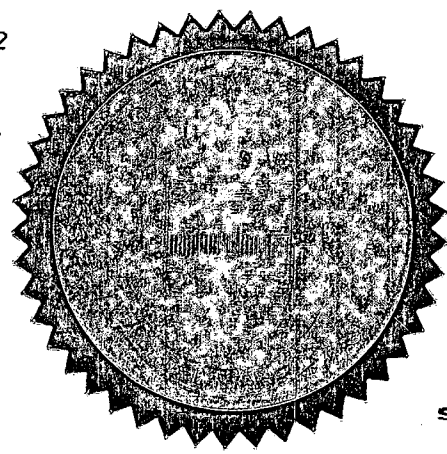
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

En la Notaria Cuarenta de este Circuito se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.

28 DIC. 2009

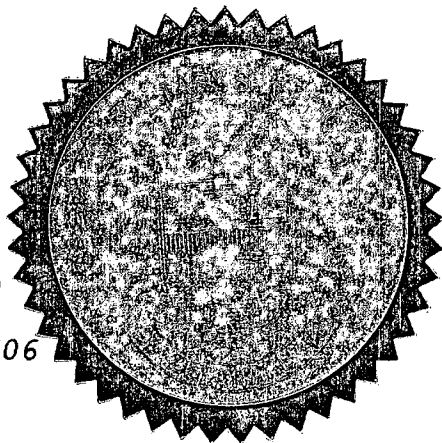
NOTARIA CUARENTA (E)
Bogotá, D.C., Colombia
Diana Patricia Martínez

Delaware

PAGE 1

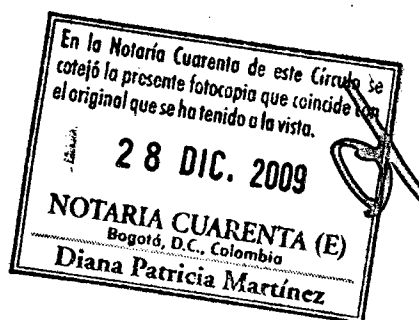
The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

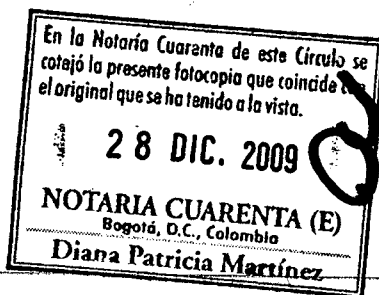
GENENTECH, INC.

By:

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

86747



APOSTILLA

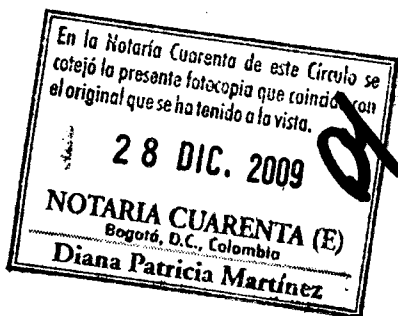
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

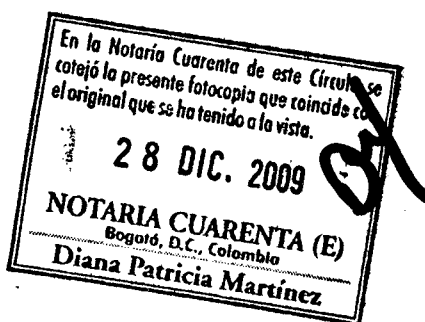
Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



203

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900386

FECHA: 05 - 24 - 05

704

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

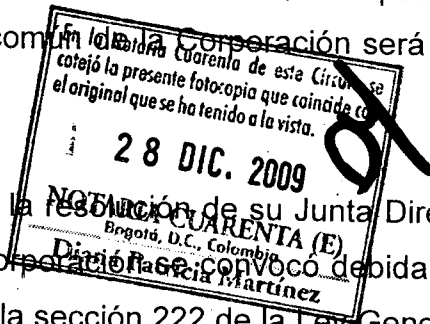
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación fue convocada debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



205

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

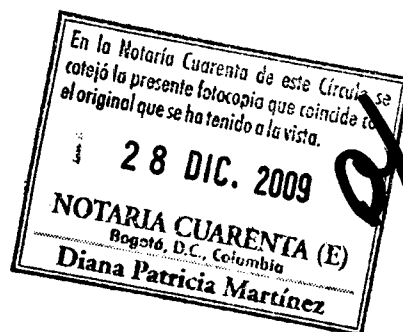
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.





No. 10-061143- -00000-0000

Fecha: 2010-05-21 16:44:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 205

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONESPATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐
☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita 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 (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐Incompleta ☐PATENTE DE INVENCION PCT ☐MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita una PCT

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐Incompleta ☐DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita 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 ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH, INC.

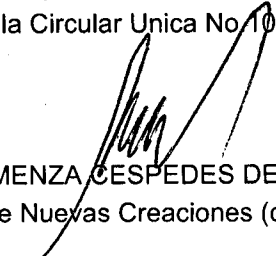
REFERENCIA	Radicación No.	10 061143
	Solicitud internacional	PCT/US2008/082465
	Fecha inicio fase nacional	09/06/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	208157

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
Directora de Nuevas Creaciones (c)

25 JUN. 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11