CSA125665

Organización y Digitalización CSA Ltda.

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

[illegible]

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 10-78672

54. **TÍTULO** ANTICUERPOS ANTI-VEGF

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** GENENTECH, INC.

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D.C.,**

(FORMA P-10)

Título

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-078672- -00000-0000
Fecha: 2010-06-29 17:50:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 362

FORMULARIO UNICO 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 (71)

Nombre: **GENENTECH, INC.**
Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Dirección: 1 DNA Way,
South San Francisco,
California 94080-4990,
Estados Unidos de América

Domicilio: South San Francisco,
California,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 35.456.344 T.P 23.555

4 INVENTOR (ES) (72)

1. Germaine FUH
149 Amapola Avenue,
Pacifica,
California 94044,
Estados Unidos de América

2. Chingwei V. LEE
840 Sea Spray Lane, Apt. 112,
Foster City,
California 94404,
Estados Unidos de América

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/013248 Fecha: 1 de diciembre de 2008
Publicación Internacional No. WO 2009/073160 A1 Fecha: 11 de junio de 2009

6 Título (54)

ANTICUERPOS ANTI-VEGF (Folio 366)

7 Clasificación Internacional (51) C07K 016/000

8 Prioridad SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	30 de noviembre de 2007	60/991,302

9

Comprobante de pago No.: 10-30,000 **Fecha:** 20 de abril de 2010
Comprobante de pago No.: 10-46,665 **Fecha:** 8 de junio de 2010

10

Anexos:

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 554.000.oo.
- [x] Comprobante de pago por 24 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por $624.000.oo.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [x] 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.
- [x] Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

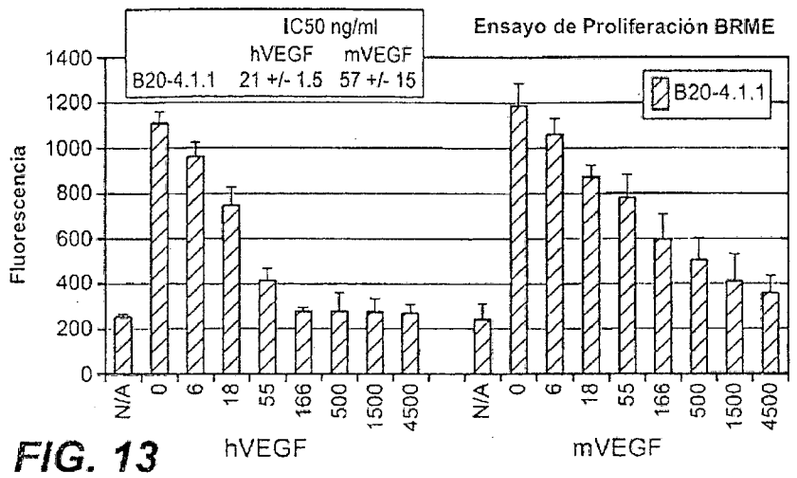


FIG. 13

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia de Páez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/073160 A1

   Descripción:

   Páginas 122 en el idioma original

   Páginas 182 en español

   Reivindicaciones: Número (s) 34

   Figuras: Número (s) 16

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostilla para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

18563
9306

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned
GENENTECH, INC.
domiciliado (s) en/of **1 DNA Way,**
South San Francisco, California, 94080-4990, U.S.A.

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro funcionario Público, o Cónsul de Colombia en el extranjero; y si se trata de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a 72 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the other alternates, in the order of their appointment, as our representatives in industrial property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representative through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad. In case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn cease, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of the exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso- administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales,

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above mentioned attorneys at law so that they may obtain the protection of my/our industrial property and against the unfair competition, for which part I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before authorities or persons, with or without jurisdiction, specially administrative, administrative-litigious and judicial, as well as Arbitration Courts, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; registration of trademarks, collective, defensive, service marks, slogans, commercial names, Colombian domain names and

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

© CAVELIER ABOGADOS

6

enseñas. nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso. cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignm... change of name or domicile, voluntary cancellation; and the regist... of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair compet... protection to the consumer, oppositions or observations, administrati... Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the a... for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in gener... civil, penal, and administrative suits relating to those rights: action... suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the ... matters they may substitute this Power of Attorney, compr... conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resi... ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 12th day of December, 2002

en/in South San Francisco, California

por/by _____

Firma _____ Signature

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

Pls. see attached California
Notary all Purpose acknowledgment.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

© CAVELIER ABOGADOS

4

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 MARIA P. PEREZ*
3. *acting in the capacity of DEPUTY CLERK, County of SAN MATEO, State of California*
4. *bears the seal/stamp of the County of SAN MATEO, State of California*

CERTIFIED

5. *At San Francisco, California*
6. *The 20TH day of DECEMBER, 2002*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 49359*
9. *Seal/Stamp:*
10. *Signature*

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

BILL JONES
Secretary of State

BY _____

NP-24 A (Rev. 1-96)

OSP 99 21639

8

STATE OF CALIFORNIA
COUNTY OF SAN MATEO ss

I, WARREN SLOCUM, Assessor-County Clerk-Recorder, County of San Mateo, State of California, having by law a seal,

Do HEREBY CERTIFY, That TERI RENSHAW
Whose name is subscribed to the Certificate of Proof or acknowledgement of the annexed instrument and thereon written, was at the time of taking such proof or acknowledgement, a Notary Public in and for said County, residing therein, duly commissioned and sworn, and duly authorized by the laws of said state to administer oaths, take acknowledgements and proofs of deeds or conveyances for land, tenements or hereditaments in said State, to be recorded therein. And further that I am well acquainted with the handwriting of such Notary Public, and verily believe that the signature to said Certificate of Proof or acknowledgement is genuine, and that said instrument is executed and acknowledged according to the laws of said State. I further certify that an impression of the seals of Notaries Public is not required by law to be filed in my office.

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the Assessor-County Clerk-Recorder, this 20 day of December 20 02

WARREN SLOCUM, Assessor-County Clerk-Recorder

By Maria P. Perez MARIA P. PEREZ
Deputy Clerk, County of San Mateo

Noublic Vesf

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CORRESPONDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo } ss.

On 12-12-2002 (Date) before me, Teri Renshaw, Notary Public (Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public"))

personally appeared Timothy R. Schwartz (Name(s) of Signer(s)),

☑ 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.

TERI RENSHAW
Commission # 1272761
Notary Public - California
San Mateo County
My Comm. Expires Aug 3, 2004

WITNESS my hand and official seal.

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.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Colombia Poa

Document Date: 12-12-2002

Signer(s) Other Than Named Above: none

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Section Patent Counsel
Genentech, Inc.
Authorized Corporate Signatory

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

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

© 1999 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.nationalnotary.org Prod. No. 5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

10.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy 16 de Diciembre de 2002

~~Compareció(ron) ante mí~~ El suscrito Timothy R. Schwartz

quien(es) ~~me conoce(n) personalmente y que~~ firma(n) este documento en representación de la Sociedad/compañía denominada GENENTECH, INC.

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

ARTICULOS DE CONSTITUCION FECHADO JUNIO 1999 Y ESTATUTOS FECHADOS JUNIO 1999; CON SUS RESPECTIVOS MODIFICACIONES.

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que GENENTECH, INC. es una Sociedad/Compañía legalmente constituída y existente de acuerdo con las leyes del Estado de Delaware.

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es 1 DNA Way, South San Francisco, California, 94080-4990, Estados Unidos de América

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) Timothy R. Schwartz

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad South San Francisco

Estado California

Hoy 16 Diciembre de 2002

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

~~NOTARIAL~~ OFFICER CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 16th day of December 2002

~~appeared before me~~ The undersigned,

Timothy R. Schwartz,

~~who(m) I know personally and~~ who(m) signed this document as representative(s) of the Corporation/Company named GENENTECH, INC.

I certify:

1. That I have seen the following documents:* Articles of Incorporation dated June 1999; Bylaws dated June 1999 ; both as amended from time to time.

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That GENENTECH, INC. is a Corporation/Company legally constituted and in existence in accordance with the laws of the State of Delaware.

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is 1 DNA Way, South San Francisco, California, 94080-4990, United States of America

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C., DAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporate purposes set forth in the Articles of Incorporation of the Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Timothy R. Schwartz

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City South San Francisco

State California

This 16th day of December, 2002

~~Notario Público o Funcionario Autorizado — Notary Public or Attesting Official~~

[ATTACH NOTARY ACKNOWLEDGEMENT]

11

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 MARIA P. PEREZ*

3. *acting in the capacity of DEPUTY CLERK, County of SAN MATEO, State of California*

4. *bears the seal/stamp of the County of SAN MATEO, State of California*

CERTIFIED

5. *At San Francisco, California* 6. *The 20TH day of DECEMBER, 2002*

7. *by Deputy Secretary of State, State of California*

8. *No. 49358*

9. *Seal/Stamp:*

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

OFFICE OF THE SECRETARY OF STATE

10. *Signature*

BILL JONES
Secretary of State

BY _____

NP-24 A (Rev. 1-96)

OSP 99 21639

STATE OF CALIFORNIA
COUNTY OF SAN MATEO ss

12

I, WARREN SLOCUM, Assessor-County Clerk-Recorder, County of San Mateo, State of California, having by law a seal,

Do HEREBY CERTIFY, That TERI RENSHAW
Whose name is subscribed to the Certificate of Proof or acknowledgement of the annexed instrument and thereon written, was at the time of taking such proof or acknowledgement, a Notary Public in and for said County, residing therein, duly commissioned and sworn, and duly authorized by the laws of said state to administer oaths, take acknowledgements and proofs of deeds or conveyances for land, tenements or hereditaments in said State, to be recorded therein. And further that I am well acquainted with the handwriting of such Notary Public, and verily believe that the signature to said Certificate of Proof or acknowledgement is genuine, and that said instrument is executed and acknowledged according to the laws of said State. I further certify that an impression of the seals of Notaries Public is not required by law to be filed in my office.

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the Assessor-County Clerk-Recorder, this 20 day of December 20 02

WARREN SLOCUM, Assessor-County Clerk-Recorder

By Maria P. Perez MARIA P. PEREZ
Deputy Clerk, County of San Mateo

Republic Verif

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

R3

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo } ss.

On 12-16-2002 (Date) before me, Teri Renshaw, Notary Public (Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public"))

personally appeared Timothy R. Schwartz (Name(s) of Signer(s)),

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

TERI RENSHAW
Commission # 1272761
Notary Public - California
San Mateo County
My Comm. Expires Aug 3, 2004

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.

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

CONSUL NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Certificate of ...
Document Date: 12-16-2002
Number of Pages:
Signer(s) Other Than Named Above: none

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: _____

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

© 1999 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.nationalnotary.org Prod. No. 5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

14

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 10.01/03 realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de Representación y Poder escrito en inglés y español por medio del cual **GENENTECH, INC.** domiciliado en el 1 DNA Way, South San Francisco, California, 94080-4990, Estados Unidos de América, otorga derechos de Representación y Poder a los Doctores EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, tpa. 23555 y GERMÁN CAVELIER, tpa. 832.

Dado y firmado en 12 de diciembre de *2002*

En *South San Francisco, Claifornia*

Por _____

_____

Firma *Firma ilegible*

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Sección Asesoría Legal en Patentes
Genentech, Inc.
Signatario Corporativo Autorizado

Por favor referirse al Certificado Notarial Multipropósito de California adjunto.

ACTA NOTARIAL DE RECONOCIMIENTO MULTIPROPÓSITOS DE CALIFORNIA

Estado de California

SS.

Condado de *San Mateo*

Diego F. Vargas

DIEGO F. VARGAS T.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

El *12-12-2002* ante mí, *Teri Renshaw, Notario Público*

Nombre y Cargo del Funcionario (p.e. "Juan Pérez, Notario Público)

15

compareció personalmente *Timothy R. Schwartz*
Nombre(s) del Firmante(s)

☑ a quien conozco personalmente

☐ probó ante mí con evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre está suscrito en el documento y reconoció ante mí que él ejecutó el mismo en su calidad autorizada y que por medio de su firma en el documento la persona o la entidad a nombre de quien dicha persona actuó, ejecutó el documento.

TERI RENSHAW
Comisión # 1272761
Notario Público - California
Condado de Santa Mateo
Comisión vence Agosto 3 de 2004
Sello circular al interior ilegible

TESTIFICA mí firma y sello oficial.

Firma Ilegible
Firma del Notario Público

OPCIONAL

Aunque la siguiente información no es obligatoria por ley, esta podría tener valor para personas que admitan el documento y podría prevenir la remoción fraudulenta y anexión de este formulario a otro documento.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Descripción del Documento Anexo

Titulo o Tipo de Documento: *Colombia Pod*

Fecha del Documento: *12-12-2002* Número de Páginas: *4*

Otros Firmante(s) distintos a los mencionados anteriormente: *ninguno*

Calidad(es) Pretendidas por el Firmante

Nombre del Firmante: _____

☐ Individuo

☐ Funcionario Corporativo Cargo(s): _____

☐ Socio-- ☐ Comanditario ☐ General

☐ Apoderado Timothy R. Schwartz, Ph. D.

☐ Fiduciario Sección de Asesoría Legal en Patentes

☐ Guardián o Curador Genentch, Inc.

☐ Signatario Corporativo Autorizado

HUELLA DEL PULGAR
DERECHO DEL FIRMANTE
Punta del Pulgar Aquí

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

16

☐ Otro:_____

El firmante Representa a:_____

© 1999 Asociación Nacional de Notarios * 9350 De Sote Ave., P.O. Box 2402 * Chatsworth, CA 91313-2402.www.nationalnotary.org Prod. No. 5907 Pedidos: Llame Gratis al 1-800-876-6827

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE SAN MATEO ss

Yo, WARREN SLOCUM, Registrador-Secretario de Condado-Asesor, del Condado de San Mateo, Estado de California, que tiene por ley un sello,

POR EL PRESENTE CERTIFICO, Que TERI RENSHAW

Cuyo nombre está suscrito en el Certificado de prueba o reconocimiento del anexo instrumento y en él suscrito, era al momento de tomar dicha prueba o reconoc[illegible]blico en y para dicho Condado, residente dentro del mismo debidamente comisionado y juramentado, y debidamente [illegible]yes de dicho estado para administrar juramentos, tomar reconocimientos y pruebas de escrituras o transferencias de tierras, inmuebles o herencias en dicho Estado, a ser registrado en él. Y adicionalmente que estoy bien familiarizado con la escritura de dicho Notario Público y verdaderamente creo que la firma en dicho certificado de prueba o reconocimiento es auténtica, y que dicho instrumento está suscrito y reconocido de acuerdo a las leyes de dicho Estado. Adicionalmente certifico que la ley no requiere que se presente una impresión de los sellos de notario ante mí oficina.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTEAGA
NOTARIA

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

1f

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he suscrito y fijado el sello de Registrador-Secretario de Condado-Asesor hoy 20 de Diciembre de 2002

Firma Ilegible

WARREN SLOCUM, Registrador, Secretario de Condado-Asesor

Por: *Firma Ilegible* *MARIA P. PEREZ*

Suplente del Secretario, Condado de San Mateo

Estado de California

CONSULADO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

1. *País: Estados Unidos de América*

   Este documento público

2. *ha sido firmado por MARIA P. PEREZ*

3. *actuando en calidad de SECRETARIO SUPLENTE, Condado de SAN MATEO, Estado de California*

4. *lleva el sello/estampilla del Condado de SAN MATEO,*

   Estado de California

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

18

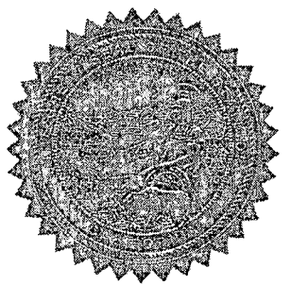
CERTIFICADO

5. *En San Francisco, California* 6. *El 20 de DICIEMBRE de 2002*

7. *por el Suplente del Secretario de Estado, Estado de California*

8. ***No. 49359***

9. *Sello/estampilla:*



10. *Firma*

Bill Jones
Bill Jones
Secretario de Estado

Por *Firma ilegible*

Sello obtenido por escáner con inscripción: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA

Sellos parciales en tinta roja sobre los dos documentos anteriores con la inscripción. EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. PAGO CONSTA QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTUNDUAGA
NOTARIA

CERTIFICADO DE UN FUNCIONARIO (SOCIEDAD) del 16 de diciembre de 2002 por medio del cual el suscrito Timothy R. Schwartz, certifica que GENENTECH, INC. es una sociedad debidamente constituida y existente de acuerdo a las leyes de Delaware y que el domicilio de dicha compañía es 1 DNA Way, South San Francisco, California, 94080-4990, Estados Unidos de América. Adicionalmente certifica que el Señor Timothy R. Schwartz está autorizado para otorgar el presente Poder. Dado y firmado en South San Francisco, Estado de California hoy 16 de diciembre de 2003.

Firma Ilegible

Timothy R. Schwartz, Ph.D.

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA. BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

21 JUN. 2010

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

Dirección Jurídica

002202

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2003 JAN 14 A 11:36

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Sección Asesoría Legal en Patentes
Genentech, Inc.
Signatario Corporativo Autorizado

ACTA NOTARIAL DE RECONOCIMIENTO MULTIPROPÓSITOS DE CALIFORNIA

Estado de California
SS.
Condado de *San Mateo*

El *12-16-2002* ante mí, *Teri Renshaw, Notario Público*
Nombre y Cargo del Funcionario (p.e. "Juan Pérez, Notario Público)

compareció personalmente *Timothy R. Schwartz*
Nombre(s) del Firmante(s)

☑ a quien conozco personalmente

☐ probó ante mí con evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre está suscrito en el documento y reconoció ante mí que él ejecutó el mismo en su calidad autorizada y que p[illegible] en el documento la [illegible] a nombre de quien dicha persona actuó ejecutó el docume[illegible]

TERI RENSHAW
Comisión # 1272761
Notario Público - California
Condado de Santa Mateo
Comisión vence Agosto 3 de 2004
Sello circular al interior ilegible

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

TESTIFICA mí firma y sello oficial.

Firma Ilegible
Firma del Notario Público

OPCIONAL

Aunque la siguiente información no es obligatoria por ley, esta podría tener valor para aquellas personas que admitan el documento y podría prevenir la remoción fraudulenta y anexión de este formato a otro documento.

Descripción del Documento Anexo

Titulo o Tipo de Documento: *Funcionario Certificado*

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

20.

Fecha del Documento: *12-16-2002* Número de Páginas: 1

Otros Firmante(s) distintos a los mencionados anteriormente: *ninguno*

Calidad(es) Pretendidas por el Firmante

Nombre del Firmante: _____

☐ Individuo

☐ Funcionario Corporativo Cargo(s): _____

☐ Socio-- ☐ Comanditario ☐ General

☐ Apoderado

☐ Fiduciario

☐ Guardián o Curador

☐ Otro: _____

El firmante Representa a: _____

HUELLA DEL PULGAR
DERECHO DEL FIRMANTE
Punta del Pulgar Aquí

© 1999 Asociación Nacional de Notarios * 9350 De Sote Ave., P.O. Box 2402 * Chatsworth, CA 91313-2402.www.nationalnotary.org Prod. No. 5907 Pedidos: Llame Gratis al 1-800-876-6827

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE SAN MATEO ss

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Yo, WARREN SLOCUM, Registrador-Secretario-Abogado-Asesor, del Condado de San Mateo, Estado de California, que tiene por ley un sello,

POR EL PRESENTE CERTIFICO, Que TERI RENSHAW

Cuyo nombre está suscrito en el Certificado de prueba o reconocimiento del anexo instrumento y en él suscrito, era al momento de tomar dicha prueba o reconocimiento, un Notario Público en y para dicho Condado, residente dentro del mismo, debidamente comisionado y juramentado, y debidamente autorizado por las leyes de dicho estado para administrar juramentos, tomar reconocimientos y

DIEGO F. VARGAS T.
Diego F. Vargas
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

pruebas de escrituras o transferencias de tierras, inmuebles o herencias en dicho Estado, a ser registrado en él. Y adicionalmente que estoy bien familiarizado con la escritura de dicho Notario Público y verdaderamente creo que la firma en dicho certificado de prueba o reconocimiento es auténtica, y que dicho instrumento está suscrito y reconocido de acuerdo a las leyes de dicho Estado. Adicionalmente certifico que la ley no requiere que se presente una impresión de los sellos de notario ante mí oficina.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he suscrito y fijado el sello de Registrador-Secretario de Condado-Asesor hoy 20 de Diciembre de 2002

Firma Ilegible

WARREN SLOCUM, Registrador, Secretario de Condado-Asesor

Por: *Firma Ilegible* *MARIA P. PEREZ*

Suplente del Secretario,

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Estado de California

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑO
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

22

1. *País:* *Estados Unidos de América*

Este documento público

2. *ha sido firmado por MARIA P. PEREZ*

3. *actuando en calidad de SECRETARIO SUPLENTE, Condado de SAN MATEO, Estado de California*

4. *lleva el sello/estampilla del Condado de SAN MATEO,*

Estado de California

CERTIFICADO

5. *En San Francisco, California* 6. *El 20 de DICIEMBRE de 2002*

7. *por el Suplente del Secretario de Estado, Estado de California*

8. ***No. 49358***

9. *Sello/estampilla:*

10. *Firma*

Bill Jones

Bill Jones

Secretario de Estado

Por *Firma ilegible*

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Sello obtenido por escáner con inscripción: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA

Sellos parciales en tinta roja sobre los lados derechos de los dos documentos anteriores con la inscripción. EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ/ID-4082/WPCL002G/COLO 13563-701-001-2

DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 14 JAN 2003

REPUBLICA DE COLOMBIA
Javier Bermudez
Notario Sexto
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2003 JAN 14 A 11:36

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

002201

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

21 JUN. 2010

AMPARO OURTENO ARTURO
NOTARIA

CAVELIER
ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

23

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : **GENENTECH, INC.**

Poder conferido el : 12/12/2002

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,

EMILIO FERRERO
T.P.A. N° 31.929
C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
T.P.A. N° 23.555
C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

13563

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
Bogotá, D.C.
Ante mi AMPARO QUINTERO ARTURO 04 NOV 2009
NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTA, D.C.
Compareció(eron)
Que firma(n) este(a) documento y exhibió(eron) la(s) C.C.
Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)
en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
que el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta diligencia.

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Amparo Quintero Arturo
NOTARIA
NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
21 JUN. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
11 June 2009 (11.06.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/073160 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/00 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/013248

(22) International Filing Date:
1 December 2008 (01.12.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/991,302 30 November 2007 (30.11.2007) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **GENENTECH, INC.** [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **FUH, Germaine** [US/US]; 149 Amapola Avenue, Pacifica, CA 94044 (US). **LEE, Chingwei, V.** [—/US]; 840 Sea Spray Lane, Apt 112, Foster City, CA 94404 (US).

(74) Agent: **ELBING, Karen, L.**; Clark & Elbing LLP, 101 Federal Street, Boston, Massachusetts 02110 (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*

(54) Title: ANTI-VEGF ANTIBODIES

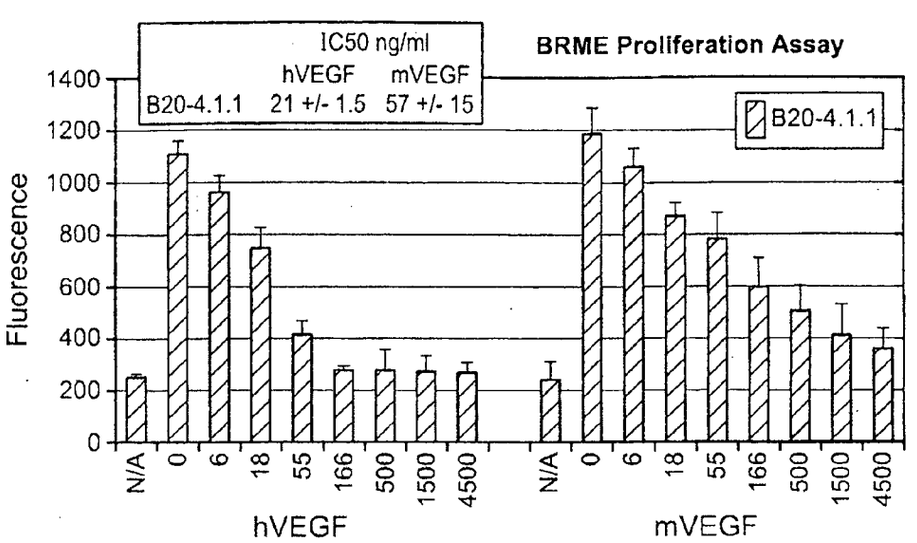


FIG. 13

(57) Abstract: The invention herein provides isolated antibodies that bind to VEGF. The invention further provides methods of making anti-VEGF antibodies, and polynucleotides encoding anti-VEGF antibodies.

WO 2009/073160 A1

ANTI-VEGF ANTIBODIES

FIELD OF THE INVENTION

[0001] This invention relates generally to anti-VEGF selected polypeptide sequences and antibodies with beneficial properties for research, therapeutic and diagnostic purposes.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Development of a vascular system is a fundamental requirement for many physiological and pathological processes. Actively growing tissues such as embryos and tumors require adequate blood supply. They satisfy this need by producing pro-angiogenic factors, which promote new blood vessel formation via a process called angiogenesis. Vascular tube formation is a complex but orderly biological event involving all or many of the following steps: a) Endothelial cells (ECs) proliferate from existing ECs or differentiate from progenitor cells; b) ECs migrate and coalesce to form cord-like structures; c) vascular cords then undergo tubulogenesis to form vessels with a central lumen; d) existing cords or vessels send out sprouts to form secondary vessels; e) primitive vascular plexus undergo further remodeling and reshaping; and f) peri-endothelial cells are recruited to encase the endothelial tubes, providing maintenance and modulatory functions to the vessels; such cells including pericytes for small capillaries, smooth muscle cells for larger vessels, and myocardial cells in the heart. 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).

[0003] It is well established that angiogenesis is implicated in the pathogenesis of a variety of disorders. These include solid tumors and metastasis, atherosclerosis, retrolental fibroplasia, hemangiomas, chronic inflammation, intraocular neovascular diseases such as proliferative retinopathies, *e.g.*, diabetic retinopathy, age-related macular degeneration (AMD), neovascular glaucoma, immune rejection of transplanted corneal tissue and other tissues, rheumatoid arthritis, and psoriasis. Folkman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934 (1992); Klagsbrun *et*

al., *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-239 (1991); and Garner A., "Vascular diseases," In: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710.

[0004] In the case of tumor growth, angiogenesis appears to be crucial for the transition from hyperplasia to neoplasia, and for providing nourishment for the growth and metastasis of the tumor. Folkman *et al.*, *Nature* 339:58 (1989). The neovascularization allows the tumor cells to acquire a growth advantage and proliferative autonomy compared to the normal cells. A tumor usually begins as a single aberrant cell, which can proliferate only to a size of a few cubic millimeters due to the distance from available capillary beds, and it can stay 'dormant' without further growth and dissemination for a long period of time. Some tumor cells then switch to the angiogenic phenotype to activate endothelial cells, which proliferate and mature into new capillary blood vessels. These newly formed blood vessels not only allow for continued growth of the primary tumor, but also for the dissemination and recolonization of metastatic tumor cells. Accordingly, a correlation has been observed between density of microvessels in tumor sections and patient survival in breast cancer as well as in several other tumors. Weidner *et al., N. Engl. J. Med* 324:1-6 (1991); Horak *et al., Lancet* 340:1120-1124 (1992); Macchiarini *et al., Lancet* 340:145-146 (1992). The precise mechanisms that control the angiogenic switch is not well understood, but it is believed that neovascularization of tumor mass results from the net balance of a multitude of angiogenesis stimulators and inhibitors (Folkman, *Nat Med* 1(1):27-31 (1995)).

[0005] The process of vascular development is tightly regulated. To date, a significant number of molecules, mostly secreted factors produced by surrounding cells, have been shown to regulate EC differentiation, proliferation, migration and coalescence into cord-like structures. For example, vascular endothelial growth factor (VEGF) has been identified as the key factor involved in stimulating angiogenesis and in inducing vascular permeability. Ferrara *et al., Endocr. Rev.* 18:4-25 (1997). The finding that the loss of even a single VEGF allele results in embryonic lethality points to an irreplaceable role played by this factor in the development and differentiation of the vascular system. Furthermore, VEGF has been shown to be a key mediator of neovascularization associated with tumors and intraocular disorders. Ferrara *et al., Endocr. Rev. supra.* The VEGF mRNA is overexpressed by the majority of human

tumors examined. Berkman *et al., J. Clin. Invest.* 91:153-159 (1993); Brown *et al., Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown *et al., Cancer Res.* 53:4727-4735 (1993); Mattern *et al., Brit. J. Cancer* 73:931-934 (1996); Dvorak *et al., Am. J. Pathol.* 146:1029-1039 (1995).

[0006] Also, the concentration levels of VEGF in eye fluids are highly correlated to the presence of active proliferation of blood vessels in patients with diabetic and other ischemia-related retinopathies. Aiello *et al., N. Engl. J. Med.* 331:1480-1487 (1994). Furthermore, studies have demonstrated the localization of VEGF in choroidal neovascular membranes in patients affected by AMD. Lopez *et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:855-868 (1996).

[0007] Anti-VEGF neutralizing antibodies suppress the growth of a variety of human tumor cell lines in nude mice (Kim *et al., Nature* 362:841-844 (1993); Warren *et al., J. Clin. Invest.* 95:1789-1797 (1995); Borgström *et al., Cancer Res.* 56:4032-4039 (1996); Melnyk *et al., Cancer Res.* 56:921-924 (1996)) and also inhibit intraocular angiogenesis in models of ischemic retinal disorders. Adamis *et al., Arch. Ophthalmol.* 114:66-71 (1996). Therefore, anti-VEGF monoclonal antibodies or other inhibitors of VEGF action are promising candidates for the treatment of tumors and various intraocular neovascular disorders. Such antibodies are described, for example, in EP 817,648 published January 14, 1998; and in WO98/45331 and WO98/45332, both published October 15, 1998. One of the anti-VEGF antibodies, bevacizumab, has been approved by the FDA for use in combination with a chemotherapy regimen to treat metastatic colorectal cancer (CRC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). And bevacizumab is being investigated in many ongoing clinical trials for treating various cancer indications.

[0008] Other anti-VEGF antibodies, anti-Nrp1 antibodies and anti-Nrp2 antibodies are also known, and described, for example, in Liang *et al., J Mol Biol* 366, 815-829 (2007) and Liang *et al., J Biol Chem* 281, 951-961 (2006), PCT publication number WO2007/056470 and PCT Application No. PCT/US2007/069179, the content of these patent applications are expressly incorporated herein by reference.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0009] The invention provides novel anti-VEGF antibodies and uses thereof.

[0010] A number of anti-VEGF antibodies are provided in the invention. For example, an antibody that binds to VEGF or a fragment thereof is provided, wherein the antibody comprises six HVRs selected from:

(i) an HVR-L1 comprising the amino acid sequence of $X_1X_2R\ X_3SL$ wherein the HVR-L1 comprises 1, 2 or 3 substitutions in any combination of the following positions: X_1 is G or A; X_2 is V or I; and/or X_3 is T or R;

(ii) an HVR-L2 comprising the amino acid sequence of DASSLA (SEQ ID NO:6);

(iii) an HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SYKSPL (SEQ ID NO:7);

(iv) an HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SISGSWIF (SEQ ID NO:1);

(v) an HVR-H2 comprising the amino acid sequence of GAIWPFGGYTH (SEQ ID NO:2).; and

(vi) an HVR-H3 comprising the amino acid sequence of RWGHSTSPWAMDY (SEQ ID NO:3).

[0011] In another embodiment, an antibody that binds to VEGF or a fragment thereof is provided, wherein the antibody comprises:

(1) an HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1;

(2) an HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2;

(3) an HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3

(4) an HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4;

(5) an HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:6; and

(6) an HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:7.

[0012] In another embodiment, an antibody that binds to VEGF or a fragment thereof is provided, wherein the antibody comprises:

(1) an HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1;

(2) an HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2;

(3) an HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3

(4) an HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:5;

(5) an HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:6; and

(6) an HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:7.

[0013] In another embodiment, an antibody that binds to VEGF or a fragment thereof is provided, wherein the light chain variable domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:44 or SEQ ID NO:45.

[0014] In another embodiment, an antibody that binds to VEGF or a fragment thereof is provided, wherein the anti-VEGF antibody comprises the heavy chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:43, and the light chain variable domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:44 or 45. In yet another embodiment, the anti-VEGF antibody comprises the heavy chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:43, and the light chain variable domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:44. In yet another embodiment, the anti-VEGF antibody comprises the heavy chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:43, and the light chain variable domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:45.

[0015] In certain embodiments, any of the above antibodies is a monoclonal antibody. In one embodiment, the antibody is an antibody fragment selected from a Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, or $(Fab')_2$ fragment. In one embodiment, the antibody is humanized. In one embodiment, the antibody is human. In yet another embodiment, at least a portion of the framework sequence is a human consensus framework sequence.

[0016] Polynucleotides encoding any of the above antibodies are provided, as well as vectors comprising the polynucleotides and host cells comprising the vectors of the invention. In one embodiment, the host cell is eukaryotic. In another embodiment, the host cell is a CHO cell. A method of making an anti-VEGF antibody is also provided. For example, a method comprises culturing the host cell under conditions suitable for expression of the polynucleotide encoding the antibody, and isolating the antibody.

[0017] In one aspect, a method of detecting the presence of VEGF in a biological sample is provided, the method comprising contacting the biological sample with an antibody of the invention under conditions permissive for binding of the antibody to VEGF, and detecting whether a complex is formed between the antibody and VEGF. In one embodiment, the method comprises detecting VEGF-anti-VEGF antibody complex in a biological sample wherein the amino acid sequence

of the anti-VEGF antibody comprises a heavy chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:43, and a light chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:44 or 45. In yet another embodiment, the method comprises detecting VEGF-anti-VEGF antibody complex in a biological sample wherein the amino acid sequence of the anti-VEGF antibody comprises a heavy chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:43, and a light chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:44. In yet another embodiment, the method comprises detecting VEGF-anti-VEGF antibody complex in a biological sample wherein the amino acid sequence of the anti-VEGF antibody comprises a heavy chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:43, and a light chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:45. In yet another embodiment, the anti-VEGF antibody is detectably labeled.

[0018] Pharmaceutical compositions as well as methods of treatment are also provided. In one aspect, a pharmaceutical composition is provided comprising an antibody of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier. In another aspect, a method of treating cancer is provided, *e.g.*, the method comprises administering to an individual the pharmaceutical composition comprising any of the above antibodies. Cancers treated by the methods of the invention include, but are not limited to, squamous cell cancer, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung, squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric cancer, gastrointestinal cancer, gastrointestinal stromal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, liver cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma and various types of head and neck cancer, melanoma, superficial spreading melanoma, lentigo maligna melanoma, acral lentiginous melanomas, nodular melanomas, B-cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia (CLL); acute lymphoblastic leukemia (ALL); hairy cell leukemia; chronic myeloblastic leukemia; post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD), abnormal vascular proliferation associated with phakomatoses, edema associated with brain tumors, or Meigs' syndrome. In certain embodiments, the tumor, cancer or cell proliferative disorder

being treated colon cancer, lung cancer, breast cancer or glioblastoma. In yet another embodment, the subject being treated is human.

[0019] The invention further provides immunoconjugates comprising an antibody conjugated to an agent, such as a drug or cytotoxic agent.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0020] Figure 1: Heavy chain and light chain HVR loop sequences of anti-VEGF antibodies. The figures show the heavy chain HVR sequences, H1, H2, and H3, and light chain HVR sequences, L1, L2, and L3. Sequence numbering is as follows: clone B20-4.1.1 (HVR-H1 is SEQ ID NO:1; HVR-H2 is SEQ ID NO:2; HVR-H3 is SEQ ID NO:3; HVR-L1 is SEQ ID NO:4; HVR-L2 is SEQ ID NO:6; HVR-L3 is SEQ ID NO:7); and clone B20-4.1.1RR (HVR-H1 is SEQ ID NO:1; HVR-H2 is SEQ ID NO:2; HVR-H3 is SEQ ID NO:3; HVR-L1 is SEQ ID NO:5; HVR-L2 is SEQ ID NO:6; HVR-L3 is SEQ ID NO:7).

[0021] Amino acid positions are numbered according to the Kabat numbering system as described below.

[0022] Figures 2a and 2b: depict exemplary acceptor human consensus framework sequences for use in practicing the instant invention with sequence identifiers as follows:

Variable heavy (VH) consensus frameworks

human VH subgroup I consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:8)

human VH subgroup I consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:9-11)

human VH subgroup II consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:12)

human VH subgroup II consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:13-15)

human VH subgroup II consensus framework minus extended

human VH subgroup III consensus framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:16)

human VH subgroup III consensus framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:17-19)

human VH acceptor framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:20)

human VH acceptor framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:21-22)

human VH acceptor 2 framework minus Kabat CDRs (SEQ ID NO:23)

human VH acceptor 2 framework minus extended hypervariable regions (SEQ ID NOs:24-26)

[0023] Amino acid positions are numbered according to the Kabat numbering system as described below.

[0024] Figure 3: depicts exemplary acceptor human consensus framework sequences for use in practicing the instant invention with sequence identifiers as follows:

Variable light (VL) consensus frameworks

human VL kappa subgroup I consensus framework (SEQ ID NO:27)

human VL kappa subgroup II consensus framework (SEQ ID NO:28)

human VL kappa subgroup III consensus framework (SEQ ID NO:29)

human VL kappa subgroup IV consensus framework (SEQ ID NO:30)

[0025] Figure 4: depicts framework region sequences of huMAb4D5-8 heavy and light chains. Numbers in superscript/bold indicate amino acid positions according to Kabat.

[0026] Figure 5: depicts modified/variant framework region sequences of huMAb4D5-8 heavy and light chains. Numbers in superscript/bold indicate amino acid positions according to Kabat.

[0027] Figure 6: The amino acid sequences of the light chain HVR sequences L1, L2 and L3 for anti-VEGF antibodies B20-4.1.1 and B20-4.1.1RR.

[0028] Figure 7: The amino acid sequences of the heavy chain HVR sequences H1, H2, and H3 for anti-VEGF antibodies B20-4.1.1 and B20-4.1.1RR.

[0029] Figure 8: depicts the light chain variable regions of antibody clones B20-4.1.1 (SEQ ID NO:44) and B20-4.1.1RR (SEQ ID NO:45).

[0030] Figure 9: depicts the heavy chain variable regions of antibody clones B20-4.1.1 and B20-4.1.1RR (SEQ ID NO:43).

[0031] Figure 10: Table summarizing the kinetic binding affinity measurement of B20 variants IgGs to human VEGF and murine VEGF. Human or murine VEGF was immobilized to achieve approximately 60 response units.

[0032] Figure 11: Table summarizing the kinetic binding affinity measurement of B20 variants IgGs to human VEGF and murine VEGF. Human or murine VEGF was immobilized to achieve approximately 1000 response units.

[0033] Figure 12: HUVEC thymidine incorporation assay, which shows that the B20 variants can effectively inhibit the HUVEC cell proliferation.

[0034] Figure 13: depicts the effect of B20-4.1.1 on VEGF-induced BRME proliferation.

[0035] Figure 14: depicts the effect of B20-4.1.1 on tumor growth in nude mice with xenografted human tumor cells (A549 cells), as measured by tumor volumes over the number of treatment days.

[0036] Figure 15: depicts the effect of B20-4.1.1 on tumor growth in nude mice with xenografted human tumor cells (MDA-MB231 cells), as measured by tumor volumes over the number of treatment days.

[0037] Figure 16: depicts the effect of the avastin antibody on VEGF-induced BRME proliferation. Inhibition of mVEGF was not observed at a concentration of up to 1500 nM of the avastin antibody.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0038] The invention herein provides isolated antibodies that bind to VEGF and uses thereof. Pharmaceutical compositions as well as methods of treatment are also provided.

[0039] The invention further provides methods of making anti-VEGF antibodies, and polynucleotides encoding anti-VEGF antibodies.

General techniques

[0040] The techniques and procedures described or referenced herein are generally well understood and commonly employed using conventional methodology by those skilled in the art, such as, for example, the widely utilized methodologies described in Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (2003)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds.

(1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); and *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V. T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

Definitions

[0041] For purposes of interpreting this specification, the following definitions will apply and, whenever appropriate, terms used in the singular will also include the plural and vice versa. In the event that any definition set forth below conflicts with any document incorporated herein by reference, the definition set forth below shall control.

[0042] The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers monoclonal antibodies (including full length monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multispecific antibodies (*e.g.*, bispecific antibodies), and antibody fragments so long as they exhibit the desired biological activity.

[0043] The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible

mutations, *e.g.*, naturally occurring mutations, that may be present in minor amounts. Thus, the modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as not being a mixture of discrete antibodies. In certain embodiments, such a monoclonal antibody typically includes an antibody comprising a polypeptide sequence that binds a target, wherein the target-binding polypeptide sequence was obtained by a process that includes the selection of a single target binding polypeptide sequence from a plurality of polypeptide sequences. For example, the selection process can be the selection of a unique clone from a plurality of clones, such as a pool of hybridoma clones, phage clones, or recombinant DNA clones. It should be understood that a selected target binding sequence can be further altered, for example, to improve affinity for the target, to humanize the target binding sequence, to improve its production in cell culture, to reduce its immunogenicity *in vivo*, to create a multispecific antibody, etc., and that an antibody comprising the altered target binding sequence is also a monoclonal antibody of this invention. In contrast to polyclonal antibody preparations, which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody of a monoclonal antibody preparation is directed against a single determinant on an antigen. In addition to their specificity, monoclonal antibody preparations are advantageous in that they are typically uncontaminated by other immunoglobulins.

[0044] The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by a variety of techniques, including, for example, the hybridoma method (*e.g.*, Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), recombinant DNA methods (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,816,567), phage-display technologies (see, *e.g.*, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); and Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):

119-132(2004), and technologies for producing human or human-like antibodies in animals that have parts or all of the human immunoglobulin loci or genes encoding human immunoglobulin sequences (see, *e.g.*, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; and 5,661,016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); and Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

[0045] The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (see, *e.g.*,U.S. Patent No. 4,816,567; and Morrison *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Chimeric antibodies include PRIMATIZED® antibodies wherein the antigen-binding region of the antibody is derived from an antibody produced by, *e.g.*, immunizing macaque monkeys with the antigen of interest.

[0046] "Humanized" forms of non-human (*e.g.*, murine) antibodies are chimeric antibodies that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. In one embodiment, a humanized antibody is a human immunoglobulin (recipient antibody) in which residues from a HVR of the recipient are replaced by residues from a HVR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit, or nonhuman primate having the desired specificity, affinity, and/or capacity. In some instances, FR residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications may be made to further refine antibody performance. In general, a humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and

typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin, and all or substantially all of the FRs are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally will also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see, *e.g.*, Jones *et al., Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al., Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). See also, *e.g.*, Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); and U.S. Pat. Nos. 6,982,321 and 7,087,409.

[0047] A "human antibody" is one which possesses an amino acid sequence which corresponds to that of an antibody produced by a human and/or has been made using any of the techniques for making human antibodies as disclosed herein. This definition of a human antibody specifically excludes a humanized antibody comprising non-human antigen-binding residues. Human antibodies can be produced using various techniques known in the art, including phage-display libraries. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Also available for the preparation of human monoclonal antibodies are methods described in Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). See also van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Human antibodies can be prepared by administering the antigen to a transgenic animal that has been modified to produce such antibodies in response to antigenic challenge, but whose endogenous loci have been disabled, *e.g.*, immunized xenomice (see, *e.g.*, U.S. Pat. Nos. 6,075,181 and 6,150,584 regarding XENOMOUSE™ technology). See also, for example, Li *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) regarding human antibodies generated via a human B-cell hybridoma technology.

[0048] A "species-dependent antibody" is one which has a stronger binding affinity for an antigen from a first mammalian species than it has for a homologue of that antigen from a second mammalian species. Normally, the species-dependent antibody "binds specifically" to a human antigen (*i.e.*, has a binding affinity (K_d) value of no more than about 1×10^{-7} M, preferably no more than about 1×10^{-8} M and most preferably no more than about 1×10^{-9} M), but has a binding affinity for a

homologue of the antigen from a second nonhuman mammalian species which is at least about 50 fold, or at least about 500 fold, or at least about 1000 fold, weaker than its binding affinity for the human antigen. The species-dependent antibody can be any of the various types of antibodies as defined above, but preferably is a humanized or human antibody.

[0049] As used herein, "antibody mutant" or "antibody variant" refers to an amino acid sequence variant of the species-dependent antibody wherein one or more of the amino acid residues of the species-dependent antibody have been modified. Such mutants necessarily have less than 100% sequence identity or similarity with the species-dependent antibody. In one embodiment, the antibody mutant will have an amino acid sequence having at least 75% amino acid sequence identity or similarity with the amino acid sequence of either the heavy or light chain variable domain of the species-dependent antibody, in another embodiment at least 80%, in another embodiment at least 85%, in another embodiment at least 90%, and yet in another embodiment at least 95%. Identity or similarity with respect to this sequence is defined herein as the percentage of amino acid residues in the candidate sequence that are identical (*i.e*, same residue) or similar (*i.e.*, amino acid residue from the same group based on common side-chain properties, see below) with the species-dependent antibody residues, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. None of N-terminal, C-terminal, or internal extensions, deletions, or insertions into the antibody sequence outside of the variable domain shall be construed as affecting sequence identity or similarity.

[0050] An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with research, diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In some embodiments, an antibody is purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by, for example, the Lowry method, and in some embodiments, to greater than 99% by weight; (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of, for example, a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using, for example, Coomassie blue or silver stain. Isolated antibodies

includes the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

[0051] "Native antibodies" are usually heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies among the heavy chains of different immunoglobulin isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (V_H) followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end (V_L) and a constant domain at its other end; the constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light chain and heavy chain variable domains.

[0052] The "variable region" or "variable domain" of an antibody refers to the amino-terminal domains of the heavy or light chain of the antibody. The variable domain of the heavy chain may be referred to as "VH." The variable domain of the light chain may be referred to as "VL." These domains are generally the most variable parts of an antibody and contain the antigen-binding sites.

[0053] The term "variable" refers to the fact that certain portions of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated in three segments called hypervariable regions (HVRs) both in the light-chain and the heavy-chain variable domains. The more highly conserved portions of variable domains are called the framework regions (FR). The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FR regions, largely adopting a beta-sheet configuration, connected by three HVRs, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the beta-sheet structure. The HVRs in each chain are held together in close proximity by the FR regions and, with the HVRs from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies (see Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth

Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). The constant domains are not involved directly in the binding of an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody-dependent cellular toxicity.

[0054] The "light chains" of antibodies (immunoglobulins) from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequences of their constant domains.

[0055] Depending on the amino acid sequences of the constant domains of their heavy chains, antibodies (immunoglobulins) can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), *e.g.*, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, and IgA_2. The heavy chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called α, δ, ε, γ, and μ, respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known and described generally in, for example, Abbas *et al.*, *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). An antibody may be part of a larger fusion molecule, formed by covalent or non-covalent association of the antibody with one or more other proteins or peptides.

[0056] The terms "full length antibody," "intact antibody" and "whole antibody" are used herein interchangeably to refer to an antibody in its substantially intact form, not antibody fragments as defined below. The terms particularly refer to an antibody with heavy chains that contain an Fc region.

[0057] A "naked antibody" for the purposes herein is an antibody that is not conjugated to a cytotoxic moiety or radiolabel.

[0058] "Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably comprising the antigen binding region thereof. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', $F(ab')_2$, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

[0059] Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, whose name reflects its ability to crystallize readily. Pepsin

treatment yields an $F(ab')_2$ fragment that has two antigen-combining sites and is still capable of cross-linking antigen.

[0060] "Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-binding site. In one embodiment, a two-chain Fv species consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable domain in tight, non-covalent association. In a single-chain Fv (scFv) species, one heavy- and one light-chain variable domain can be covalently linked by a flexible peptide linker such that the light and heavy chains can associate in a "dimeric" structure analogous to that in a two-chain Fv species. It is in this configuration that the three HVRs of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the VH-VL dimer. Collectively, the six HVRs confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three HVRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

[0061] The Fab fragment contains the heavy- and light-chain variable domains and also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1) of the heavy chain. Fab' fragments differ from Fab fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. $F(ab')_2$ antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

[0062] "Single-chain Fv" or "scFv" antibody fragments comprise the VH and VL domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Generally, the scFv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the VH and VL domains which enables the scFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of scFv, see, *e.g.*, Pluckthün, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

[0063] The term "diabodies" refers to antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy-chain variable domain (VH) connected to a light-chain variable domain (VL) in the same polypeptide chain (VH-

VL). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies may be bivalent or bispecific. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); and Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Triabodies and tetrabodies are also described in Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

[0064] The term "hypervariable region," "HVR," or "HV," when used herein refers to the regions of an antibody variable domain which are hypervariable in sequence and/or form structurally defined loops. Generally, antibodies comprise six HVRs; three in the VH (H1, H2, H3) and three in the VL (L1, L2, L3). In native antibodies, H3 and L3 display the most diversity of the six HVRs, and H3 in particular is believed to play a unique role in conferring fine specificity to antibodies. See, *e.g.*, Xu *et al.*, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). Indeed, naturally occurring camelid antibodies consisting of a heavy chain only are functional and stable in the absence of light chain. See, *e.g.*, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

[0065] A number of HVR delineations are in use and are encompassed herein. The Kabat Complementarity Determining Regions (CDRs) are based on sequence variability and are the most commonly used (Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia refers instead to the location of the structural loops (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). The AbM HVRs represent a compromise between the Kabat HVRs and Chothia structural loops, and are used by Oxford Molecular's AbM antibody modeling software. The "contact" HVRs are based on an analysis of the available complex crystal structures. The residues from each of these HVRs are noted below.

Loop	Kabat	AbM	Chothia	Contact
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
	(Kabat Numbering)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Chothia Numbering)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0066] HVRs may comprise "extended HVRs" as follows: 24-36 or 24-34 (L1), 46-56 or 50-56 (L2) and 89-97 or 89-96 (L3) in the VL and 26-35 (H1), 50-65 or 49-65 (H2) and 93-102, 94-102, or 95-102 (H3) in the VH. The variable domain residues are numbered according to Kabat *et al.*, supra, for each of these definitions.

[0067] "Framework" or "FR" residues are those variable domain residues other than the HVR residues as herein defined.

[0068] The term "variable domain residue numbering as in Kabat" or "amino acid position numbering as in Kabat," and variations thereof, refers to the numbering system used for heavy chain variable domains or light chain variable domains of the compilation of antibodies in Kabat *et al.*, *supra.* Using this numbering system, the actual linear amino acid sequence may contain fewer or additional amino acids corresponding to a shortening of, or insertion into, a FR or HVR of the variable domain. For example, a heavy chain variable domain may include a single amino acid insert (residue 52a according to Kabat) after residue 52 of H2 and inserted residues (*e.g.*, residues 82a, 82b, and 82c, etc. according to Kabat) after heavy chain FR residue 82. The Kabat numbering of residues may be determined for a given antibody by alignment at regions of homology of the sequence of the antibody with a "standard" Kabat numbered sequence.

[0069] The Kabat numbering system is generally used when referring to a residue in the variable domain (approximately residues 1-107 of the light chain and residues 1-113 of the heavy chain) (e.g, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

(1991)). The "EU numbering system" or "EU index" is generally used when referring to a residue in an immunoglobulin heavy chain constant region (*e.g.*, the EU index reported in Kabat *et al., supra*). The "EU index as in Kabat" refers to the residue numbering of the human IgG1 EU antibody. Unless stated otherwise herein, references to residue numbers in the variable domain of antibodies means residue numbering by the Kabat numbering system. Unless stated otherwise herein, references to residue numbers in the constant domain of antibodies means residue numbering by the EU numbering system (*e.g.*, see United States Provisional Application No. 60/640,323, Figures for EU numbering).

[0070] An "affinity matured" antibody is one with one or more alterations in one or more HVRs thereof which result in an improvement in the affinity of the antibody for antigen, compared to a parent antibody which does not possess those alteration(s). In one embodiment, an affinity matured antibody has nanomolar or even picomolar affinities for the target antigen. Affinity matured antibodies may be produced using certain procedures known in the art. For example, Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describes affinity maturation by VH and VL domain shuffling. Random mutagenesis of HVR and/or framework residues is described by, for example, Barbas *et al.*, *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.*, *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

[0071] A "blocking" antibody or an "antagonist" antibody is one which inhibits or reduces biological activity of the antigen it binds. Certain blocking antibodies or antagonist antibodies substantially or completely inhibit the biological activity of the antigen.

[0072] An "agonist antibody," as used herein, is an antibody which partially or fully mimics at least one of the functional activities of a polypeptide of interest.

[0073] "Growth inhibitory" antibodies are those that prevent or reduce proliferation of a cell expressing an antigen to which the antibody binds.

[0074] Antibody "effector functions" refer to those biological activities attributable to the Fc region (a native sequence Fc region or amino acid sequence variant Fc region) of an antibody, and vary with the antibody isotype. Examples of antibody effector functions include: C1q binding and complement dependent

cytotoxicity (CDC); Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC); phagocytosis; down regulation of cell surface receptors (*e.g.*, B cell receptor); and B cell activation.

[0075] The term "Fc region" herein is used to define a C-terminal region of an immunoglobulin heavy chain, including native sequence Fc regions and variant Fc regions. Although the boundaries of the Fc region of an immunoglobulin heavy chain might vary, the human IgG heavy chain Fc region is usually defined to stretch from an amino acid residue at position Cys226, or from Pro230, to the carboxyl-terminus thereof. The C-terminal lysine (residue 447 according to the EU numbering system) of the Fc region may be removed, for example, during production or purification of the antibody, or by recombinantly engineering the nucleic acid encoding a heavy chain of the antibody. Accordingly, a composition of intact antibodies may comprise antibody populations with all K447 residues removed, antibody populations with no K447 residues removed, and antibody populations having a mixture of antibodies with and without the K447 residue.

[0076] A "functional Fc region" possesses an "effector function" of a native sequence Fc region. Exemplary "effector functions" include C1q binding; CDC; Fc receptor binding; ADCC; phagocytosis; down regulation of cell surface receptors (*e.g.*, B cell receptor; BCR), etc. Such effector functions generally require the Fc region to be combined with a binding domain (*e.g.*, an antibody variable domain) and can be assessed using various assays as disclosed, for example, in definitions herein.

[0077] A "native sequence Fc region" comprises an amino acid sequence identical to the amino acid sequence of an Fc region found in nature. Native sequence human Fc regions include a native sequence human IgG1 Fc region (non-A and A allotypes); native sequence human IgG2 Fc region; native sequence human IgG3 Fc region; and native sequence human IgG4 Fc region, as well as naturally occurring variants thereof.

[0078] A "variant Fc region" comprises an amino acid sequence which differs from that of a native sequence Fc region by virtue of at least one amino acid modification, preferably one or more amino acid substitution(s). Preferably, the variant Fc region has at least one amino acid substitution compared to a native sequence Fc region or to the Fc region of a parent polypeptide, *e.g.*, from about one to about ten amino acid substitutions, and preferably from about one to about five amino

acid substitutions in a native sequence Fc region or in the Fc region of the parent polypeptide. The variant Fc region herein will preferably possess at least about 80% homology with a native sequence Fc region and/or with an Fc region of a parent polypeptide, and most preferably at least about 90% homology therewith, more preferably at least about 95% homology therewith.

[0079] "Fc receptor" or "FcR" describes a receptor that binds to the Fc region of an antibody. In some embodiments, an FcR is a native human FcR. In some embodiments, an FcR is one which binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the FcγRI, FcγRII, and FcγRIII subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of those receptors. FcγRII receptors include FcγRIIA (an "activating receptor") and FcγRIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. Activating receptor FcγRIIA contains an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in its cytoplasmic domain. Inhibiting receptor FcγRIIB contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its cytoplasmic domain. (See, *e.g.*, Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcRs are reviewed, for example, in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel *et al., Immunomethods* 4:25-34 (1994); and de Haas *et al., J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)). Other FcRs, including those to be identified in the future, are encompassed by the term "FcR" herein.

[0080] The term "Fc receptor" or "FcR" also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) and regulation of homeostasis of immunoglobulins. Methods of measuring binding to FcRn are known (see, *e.g.*, Ghetie and Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton *et al.*).

[0081] Binding to human FcRn *in vivo* and serum half life of human FcRn high affinity binding polypeptides can be assayed, *e.g.*, in transgenic mice or transfected human cell lines expressing human FcRn, or in primates to which the polypeptides with a variant Fc region are administered. WO 2000/42072 (Presta) describes antibody variants with improved or diminished binding to FcRs. See also, *e.g.*, Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

[0082] "Human effector cells" are leukocytes which express one or more FcRs and perform effector functions. In certain embodiments, the cells express at least FcγRIII and perform ADCC effector function(s). Examples of human leukocytes which mediate ADCC include peripheral blood mononuclear cells (PBMC), natural killer (NK) cells, monocytes, cytotoxic T cells, and neutrophils. The effector cells may be isolated from a native source, *e.g.*, from blood.

[0083] "Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity" or "ADCC" refers to a form of cytotoxicity in which secreted Ig bound onto Fc receptors (FcRs) present on certain cytotoxic cells (*e.g.*, NK cells, neutrophils, and macrophages) enable these cytotoxic effector cells to bind specifically to an antigen-bearing target cell and subsequently kill the target cell with cytotoxins. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express FcγRIII only, whereas monocytes express FcγRI, FcγRII, and FcγRIII. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). To assess ADCC activity of a molecule of interest, an *in vitro* ADCC assay, such as that described in U.S. Patent No. 5,500,362 or 5,821,337 or U.S. Patent No. 6,737,056 (Presta), may be performed. Useful effector cells for such assays include PBMC and NK cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, *e.g.*, in an animal model such as that disclosed in Clynes *et al.*, *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

[0084] "Complement dependent cytotoxicity" or "CDC" refers to the lysis of a target cell in the presence of complement. Activation of the classical complement pathway is initiated by the binding of the first component of the complement system (C1q) to antibodies (of the appropriate subclass), which are bound to their cognate antigen. To assess complement activation, a CDC assay, *e.g.*, as described in Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), may be performed. Polypeptide variants with altered Fc region amino acid sequences (polypeptides with a variant Fc region) and increased or decreased C1q binding capability are described, *e.g.*, in U.S. Patent No. 6,194,551 B1 and WO 1999/51642. See also, *e.g.*, Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

[0085] The term "Fc region-comprising antibody" refers to an antibody that comprises an Fc region. The C-terminal lysine (residue 447 according to the EU numbering system) of the Fc region may be removed, for example, during purification

of the antibody or by recombinant engineering of the nucleic acid encoding the antibody. Accordingly, a composition comprising an antibody having an Fc region according to this invention can comprise an antibody with K447, with all K447 removed, or a mixture of antibodies with and without the K447 residue.

[0086] "Binding affinity" generally refers to the strength of the sum total of noncovalent interactions between a single binding site of a molecule (*e.g.*, an antibody) and its binding partner (*e.g.*, an antigen). Unless indicated otherwise, as used herein, "binding affinity" refers to intrinsic binding affinity which reflects a 1:1 interaction between members of a binding pair (*e.g.*, antibody and antigen). The affinity of a molecule X for its partner Y can generally be represented by the dissociation constant (Kd). Affinity can be measured by common methods known in the art, including those described herein. Low-affinity antibodies generally bind antigen slowly and tend to dissociate readily, whereas high-affinity antibodies generally bind antigen faster and tend to remain bound longer. A variety of methods of measuring binding affinity are known in the art, any of which can be used for purposes of the present invention. Specific illustrative and exemplary embodiments for measuring binding affinity are described in the following.

[0087] In one embodiment, the "Kd" or "Kd value" according to this invention is measured by a radiolabeled antigen binding assay (RIA) performed with the Fab version of an antibody of interest and its antigen as described by the following assay. Solution binding affinity of Fabs for antigen is measured by equilibrating Fab with a minimal concentration of (^{125}I)-labeled antigen in the presence of a titration series of unlabeled antigen, then capturing bound antigen with an anti-Fab antibody-coated plate (see, *e.g.*, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). To establish conditions for the assay, MICROTITER® multi-well plates (Thermo Scientific) are coated overnight with 5 μg/ml of a capturing anti-Fab antibody (Cappel Labs) in 50 mM sodium carbonate (pH 9.6), and subsequently blocked with 2% (w/v) bovine serum albumin in PBS for two to five hours at room temperature (approximately 23°C). In a non-adsorbent plate (Nunc #269620), 100 pM or 26 pM [^{125}I]-antigen are mixed with serial dilutions of a Fab of interest (*e.g.*, consistent with assessment of the anti-VEGF antibody, Fab-12, in Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). The Fab of interest is then incubated overnight; however, the incubation may continue for a longer period (*e.g.*, about 65 hours) to ensure that equilibrium is reached. Thereafter,

the mixtures are transferred to the capture plate for incubation at room temperature (*e.g.*, for one hour). The solution is then removed and the plate washed eight times with 0.1% TWEEN-20™ in PBS. When the plates have dried, 150 µl/well of scintillant (MICROSCINT-20™; Packard) is added, and the plates are counted on a TOPCOUNT™ gamma counter (Packard) for ten minutes. Concentrations of each Fab that give less than or equal to 20% of maximal binding are chosen for use in competitive binding assays.

[0088] According to another embodiment, the Kd or Kd value is measured by using surface plasmon resonance assays using a BIACORE®-2000 or a BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) at 25°C with immobilized antigen CM5 chips at ~10 response units (RU). Briefly, carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIACORE, Inc.) are activated with *N*-ethyl-*N'*- (3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. Antigen is diluted with 10 mM sodium acetate, pH 4.8, to 5 µg/ml (~0.2 µM) before injection at a flow rate of 5 µl/minute to achieve approximately 10 response units (RU) of coupled protein. Following the injection of antigen, 1 M ethanolamine is injected to block unreacted groups. For kinetics measurements, two-fold serial dilutions of Fab (0.78 nM to 500 nM) are injected in PBS with 0.05% TWEEN-20™ surfactant (PBST) at 25°C at a flow rate of approximately 25 µl/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are calculated using a simple one-to-one Langmuir binding model (BIACORE® Evaluation Software version 3.2) by simultaneously fitting the association and dissociation sensorgrams. The equilibrium dissociation constant (Kd) is calculated as the ratio k_{off}/k_{on}. See, *e.g.*, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). If the on-rate exceeds 106 M^{-1} s^{-1} by the surface plasmon resonance assay above, then the on-rate can be determined by using a fluorescent quenching technique that measures the increase or decrease in fluorescence emission intensity (excitation = 295 nm; emission = 340 nm, 16 nm band-pass) at 25°C of a 20 nM anti-antigen antibody (Fab form) in PBS, pH 7.2, in the presence of increasing concentrations of antigen as measured in a spectrometer, such as a stop-flow equipped spectrophometer (Aviv Instruments) or a 8000-series SLM-AMINCO™ spectrophotometer (ThermoSpectronic) with a stirred cuvette.

[0089] An "on-rate," "rate of association," "association rate," or "k_{on}" according to this invention can also be determined as described above using a BIACORE®-2000 or a BIACORE®-3000 system (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

[0090] The term "substantially similar" or "substantially the same," as used herein, denotes a sufficiently high degree of similarity between two numeric values (for example, one associated with an antibody of the invention and the other associated with a reference/comparator antibody), such that one of skill in the art would consider the difference between the two values to be of little or no biological and/or statistical significance within the context of the biological characteristic measured by said values (*e.g.*, Kd values). The difference between said two values is, for example, less than about 50%, less than about 40%, less than about 30%, less than about 20%, and/or less than about 10% as a function of the reference/comparator value.

[0091] The phrase "substantially reduced," or "substantially different," as used herein, denotes a sufficiently high degree of difference between two numeric values (generally, one associated with a molecule and the other associated with a reference/comparator molecule) such that one of skill in the art would consider the difference between the two values to be of statistical significance within the context of the biological characteristic measured by said values (*e.g.*, Kd values). The difference between said two values is, for example, greater than about 10%, greater than about 20%, greater than about 30%, greater than about 40%, and/or greater than about 50% as a function of the value for the reference/comparator molecule.

[0092] An "acceptor human framework" for the purposes herein is a framework comprising the amino acid sequence of a VL or VH framework derived from a human immunoglobulin framework or a human consensus framework. An acceptor human framework "derived from" a human immunoglobulin framework or a human consensus framework may comprise the same amino acid sequence thereof, or it may contain pre-existing amino acid sequence changes. In some embodiments, the number of pre-existing amino acid changes are 10 or less, 9 or less, 8 or less, 7 or less, 6 or less, 5 or less, 4 or less, 3 or less, or 2 or less. Where pre-existing amino acid changes are present in a VH, preferably those changes occur at only three, two, or one of positions 71H, 73H and 78H; for instance, the amino acid residues at those positions may be 71A, 73T and/or 78A. In one embodiment, the VL acceptor human

framework is identical in sequence to the VL human immunoglobulin framework sequence or human consensus framework sequence.

[0093] A "human consensus framework" is a framework which represents the most commonly occurring amino acid residues in a selection of human immunoglobulin VL or VH framework sequences. Generally, the selection of human immunoglobulin VL or VH sequences is from a subgroup of variable domain sequences. Generally, the subgroup of sequences is a subgroup as in Kabat *et al.*, *supra.* In one embodiment, for the VL, the subgroup is subgroup kappa I as in Kabat *et al.*, *supra.* In one embodiment, for the VH, the subgroup is subgroup III as in Kabat *et al.*, *supra.*

[0094] A "VH subgroup III consensus framework" comprises the consensus sequence obtained from the amino acid sequences in variable heavy subgroup III of Kabat *et al.* In one embodiment, the VH subgroup III consensus framework amino acid sequence comprises at least a portion or all of each of the following sequences: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:31)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:32)-H2-RFTISADTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:33)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:34). See Figure 4.

[0095] A "VL subgroup I consensus framework" comprises the consensus sequence obtained from the amino acid sequences in variable light kappa subgroup I of Kabat *et al.* In one embodiment, the VH subgroup I consensus framework amino acid sequence comprises at least a portion or all of each of the following sequences: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:35)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:36)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:37)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:38). See Figure 5.

[0096] As used herein, "codon set" refers to a set of different nucleotide triplet sequences used to encode desired variant amino acids. A set of oligonucleotides can be synthesized, for example, by solid phase synthesis, including sequences that represent all possible combinations of nucleotide triplets provided by the codon set and that will encode the desired group of amino acids. A standard form of codon designation is that of the IUB code, which is known in the art and described herein. A codon set typically is represented by 3 capital letters in italics, *e.g.*, *NNK, NNS, XYZ, DVK* and the like. A "non-random codon set," as used herein, thus refers to a codon

set that encodes select amino acids that fulfill partially, preferably completely, the criteria for amino acid selection as described herein. Synthesis of oligonucleotides with selected nucleotide "degeneracy" at certain positions is well known in that art, for example, the TRIM approach (Knappek *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* 296:57-86); Garrard & Henner (1993) *Gene* 128:103). Such sets of oligonucleotides having certain codon sets can be synthesized using commercial nucleic acid synthesizers (available from, for example, Applied Biosystems, Foster City, CA), or can be obtained commercially (for example, from Life Technologies, Rockville, MD). Therefore, a set of oligonucleotides synthesized having a particular codon set will typically include a plurality of oligonucleotides with different sequences, the differences established by the codon set within the overall sequence. Oligonucleotides, as used according to the invention, have sequences that allow for hybridization to a variable domain nucleic acid template and also can, but does not necessarily, include restriction enzyme sites useful for, for example, cloning purposes.

[0097] The expression "linear antibodies" refers to the antibodies described in Zapata *et al.* (1995 *Protein Eng,* 8(10):1057-1062). Briefly, these antibodies comprise a pair of tandem Fd segments (V_H-C_H1-V_H-C_H1) which, together with complementary light chain polypeptides, form a pair of antigen binding regions. Linear antibodies can be bispecific or monospecific.

[0098] As used herein, "library" refers to a plurality of antibody or antibody fragment sequences (for example, polypeptides of the invention), or the nucleic acids that encode these sequences, the sequences being different in the combination of variant amino acids that are introduced into these sequences according to the methods of the invention.

[0099] "Phage display" is a technique by which variant polypeptides are displayed as fusion proteins to at least a portion of coat protein on the surface of phage, *e.g.*, filamentous phage, particles. A utility of phage display lies in the fact that large libraries of randomized protein variants can be rapidly and efficiently sorted for those sequences that bind to a target antigen with high affinity. Display of peptide and protein libraries on phage has been used for screening millions of polypeptides for ones with specific binding properties. Polyvalent phage display methods have been used for displaying small random peptides and small proteins through fusions to either gene III or gene VIII of filamentous phage. Wells and Lowman (1992) *Curr.*

Opin. Struct. Biol. 3:355-362, and references cited therein. In a monovalent phage display, a protein or peptide library is fused to a gene III or a portion thereof, and expressed at low levels in the presence of wild type gene III protein so that phage particles display one copy or none of the fusion proteins. Avidity effects are reduced relative to polyvalent phage so that sorting is on the basis of intrinsic ligand affinity, and phagemid vectors are used, which simplify DNA manipulations. Lowman and Wells (1991) *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 3:205-0216.

[00100] A "phagemid" is a plasmid vector having a bacterial origin of replication, *e.g.*, Co1E1, and a copy of an intergenic region of a bacteriophage. The phagemid may be used on any known bacteriophage, including filamentous bacteriophage and lambdoid bacteriophage. The plasmid will also generally contain a selectable marker for antibiotic resistance. Segments of DNA cloned into these vectors can be propagated as plasmids. When cells harboring these vectors are provided with all genes necessary for the production of phage particles, the mode of replication of the plasmid changes to rolling circle replication to generate copies of one strand of the plasmid DNA and package phage particles. The phagemid may form infectious or non-infectious phage particles. This term includes phagemids, which contain a phage coat protein gene or fragment thereof linked to a heterologous polypeptide gene as a gene fusion such that the heterologous polypeptide is displayed on the surface of the phage particle.

[00101] The term "phage vector" means a double stranded replicative form of a bacteriophage containing a heterologous gene and capable of replication. The phage vector has a phage origin of replication allowing phage replication and phage particle formation. The phage is preferably a filamentous bacteriophage, such as an M13, f1, fd, Pf3 phage or a derivative thereof, or a lambdoid phage, such as lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc., or a derivative thereof.

[00102] As used herein, "solvent accessible position" refers to a position of an amino acid residue in the variable regions of the heavy and light chains of a source antibody or antigen binding fragment that is determined, based on structure, ensemble of structures and/or modeled structure of the antibody or antigen binding fragment, as potentially available for solvent access and/or contact with a molecule, such as an antibody-specific antigen. These positions are typically found in the CDRs and on the exterior of the protein. The solvent accessible positions of an antibody or antigen

binding fragment, as defined herein, can be determined using any of a number of algorithms known in the art. In one embodiment, solvent accessible positions are determined using coordinates from a 3-dimensional model of an antibody, preferably using a computer program such as the InsightII program (Accelrys, San Diego, CA). Solvent accessible positions can also be determined using algorithms known in the art (*e.g.*, Lee and Richards (1971) *J. Mol. Biol.* 55, 379 and Connolly (1983) *J. Appl. Cryst.* 16, 548). Determination of solvent accessible positions can be performed using software suitable for protein modeling and 3-dimensional structural information obtained from an antibody. Software that can be utilized for these purposes includes SYBYL Biopolymer Module software (Tripos Associates). Generally, where an algorithm (program) requires a user input size parameter, the "size" of a probe which is used in the calculation is set at about 1.4 Angstrom or smaller in radius. In addition, determination of solvent accessible regions and area methods using software for personal computers has been described by Pacios (1994) *Comput. Chem.* 18(4): 377-386.

[00103] An "angiogenic factor or agent" is a growth factor which stimulates the development of blood vessels, *e.g.*, promote angiogenesis, endothelial cell growth, stabiliy of blood vessels, and/or vasculogenesis, etc. For example, angiogenic factors, include, but are not limited to, *e.g.*, VEGF and members of the VEGF family, PlGF, PDGF family, fibroblast growth factor family (FGFs), TIE ligands (Angiopoietins), ephrins, Delta-like ligand 4 (DLL4), Del-1, fibroblast growth factors: acidic (aFGF) and basic (bFGF), Follistatin, Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), Hepatocyte growth factor (HGF) /scatter factor (SF), Interleukin-8 (IL-8), Leptin, Midkine, neuropilins, Placental growth factor, Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), Platelet-derived growth factor, especially PDGF-BB or PDGFR-beta, Pleiotrophin (PTN), Progranulin, Proliferin, Transforming growth factor-alpha (TGF-alpha), Transforming growth factor-beta (TGF-beta), Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), etc. It would also include factors that accelerate wound healing, such as growth hormone, insulin-like growth factor-I (IGF-I), VIGF, epidermal growth factor (EGF), CTGF and members of its family, and TGF-alpha and TGF-beta. See, *e.g.*, Klagsbrun and D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39; Streit and Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179; Ferrara & Alitalo (1999) *Nature*

Medicine 5(12):1359-1364; Tonini *et al.* (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (*e.g.*, Table 1 listing known angiogenic factors); and, Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206.

[00104] An "anti-angiogenesis agent" or "angiogenesis inhibitor" refers to a small molecular weight substance, a polynucleotide (including, *e.g.*, an inhibitory RNA (RNAi or siRNA)), a polypeptide, an isolated protein, a recombinant protein, an antibody, or conjugates or fusion proteins thereof, that inhibits angiogenesis, vasculogenesis, or undesirable vascular permeability, either directly or indirectly. It should be understood that the anti-angiogenesis agent includes those agents that bind and block the angiogenic activity of the angiogenic factor or its receptor. For example, an anti-angiogenesis agent is an antibody or other antagonist to an angiogenic agent as defined above, *e.g.*, antibodies to VEGF-A or to the VEGF-A receptor (*e.g.*, KDR receptor or Flt-1 receptor), anti-PDGFR inhibitors such as Gleevec™ (Imatinib Mesylate), small molecules that block VEGF receptor signaling (*e.g.*, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU11248 (sunitinib malate), AMG706, or those described in, *e.g.*, international patent application WO 2004/113304). Anti-angiogensis agents also include native angiogenesis inhibitors, *e.g.*, angiostatin, endostatin, etc. See, *e.g.*, Klagsbrun and D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39; Streit and Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179 (*e.g.*, Table 3 listing anti-angiogenic therapy in malignant melanoma); Ferrara & Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364; Tonini *et al.* (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (*e.g.*, Table 2 listing known antiangiogenic factors); and, Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206 (*e.g.*, Table 1 listing anti-angiogenic agents used in clinical trials).

[00105] The term "VEGF" or "VEGF-A" as used herein refers to the 165-amino acid human vascular endothelial cell growth factor and related 121-, 189-, and 206- amino acid human vascular endothelial cell growth factors, as described by Leung et al. (1989) *Science* 246:1306, and Houck et al. (1991) *Mol. Endocrin*, 5:1806, together with the naturally occurring allelic and processed forms thereof. The term "VEGF" also refers to VEGFs from non-human species such as mouse, rat, or primate. Sometimes the VEGF from a specific species are indicated by terms such as hVEGF for human VEGF, mVEGF for murine VEGF, etc. The term "VEGF" is also used to refer to truncated forms of the polypeptide comprising amino acids 8 to 109 or 1 to 109 of the 165-amino acid human vascular endothelial cell growth factor. Reference to any such forms of VEGF may be identified in the present application,

e.g., by "VEGF (8-109)," "VEGF (1-109)" or "$VEGF_{165}$." The amino acid positions for a "truncated" native VEGF are numbered as indicated in the native VEGF sequence. For example, amino acid position 17 (methionine) in truncated native VEGF is also position 17 (methionine) in native VEGF. The truncated native VEGF has binding affinity for the KDR and Flt-1 receptors comparable to native VEGF.

[00106] An "anti-VEGF antibody" is an antibody that binds to VEGF with sufficient affinity and specificity. In one embodiment, the anti-VEGF antibody of the invention is antibody B20-4.1.1. In yet another embodiment, the the anti-VEGF antibody of the invention is antibody B20-4.1.1RR. In yet another embodiment, the anti-VEGF antibody of the invention can be used as a therapeutic agent in targeting and interfering with diseases or conditions wherein the VEGF activity is involved. An anti-VEGF antibody will usually not bind to other VEGF homologues such as VEGF-B or VEGF-C, nor other growth factors such as PlGF, PDGF or bFGF.

[00107] The anti-VEGF antibody "Bevacizumab (BV)," also known as "rhuMAb VEGF" or "AVASTIN®," is a recombinant humanized anti-VEGF monoclonal antibody generated according to Presta *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599. It comprises mutated human IgG1 framework regions and antigen-binding complementarity-determining regions from the murine anti-hVEGF monoclonal antibody A.4.6.1 that blocks binding of human VEGF to its receptors. Approximately 93% of the amino acid sequence of Bevacizumab, including most of the framework regions, is derived from human IgG1, and about 7% of the sequence is derived from the murine antibody A4.6.1. Bevacizumab has a molecular mass of about 149,000 daltons and is glycosylated.

[00108] The term "B20 series polypeptide" as used herein refers to a polypeptide, including an antibody that binds to VEGF. B20 series polypeptides include, but are not limited to, antibodies derived from a sequence of the B20 antibody or a B20-derived antibody described in U.S. Publication No. 20060280747, U.S. Publication No. 20070141065 and/or U.S. Publication No. 20070020267, the content of these patent applications are expressly incorporated herein by reference. In one embodiment, B20 series polypeptide is B20-4.1 as described in U.S. Publication No. 20060280747, U.S. Publication No. 20070141065 and/or U.S. Publication No. 20070020267.

[00109] The term "B20-4.1.1" as used herein refers to that an antibody that binds to VEGF and comprieses an antibody wherein HVR-H1 is SEQ ID NO:1; HVR-H2 is SEQ ID NO:2; HVR-H3 is SEQ ID NO:3; HVR-L1 is SEQ ID NO:4; HVR-L2 is SEQ ID NO:6; HVR-L3 is SEQ ID NO:7.

[00110] The term "B20-4.1.1RR" as used herein refers to that an antibody that binds to VEGF and comprises an antibody wherein HVR-H1 is SEQ ID NO:1; HVR-H2 is SEQ ID NO:2; HVR-H3 is SEQ ID NO:3; HVR-L1 is SEQ ID NO:5; HVR-L2 is SEQ ID NO:6; HVR-L3 is SEQ ID NO:7.

[00111] The term "G6-31" as used herein is one of the G-6 series polypeptides as described in U.S. Publication No. 20060280747, U.S. Publication No. 20070141065 and/or U.S. Publication No. 20070020267. Other G-6 series polypeptides, as described in U.S. Publication No. 20060280747, U.S. Publication No. 20070141065 and/or U.S. Publication No. 20070020267 include, but not limited to, G6-8 and G6-23.

[00112] The term "biological activity" and "biologically active," with regard to a VEGF polypeptide, refer to physical/chemical properties and biological functions associated with VEGF.

[00113] A "VEGF antagonist" refers to a molecule capable of neutralizing, blocking, inhibiting, abrogating, reducing or interfering with VEGF activities including, but not limited to, its binding to one or more VEGF receptors. VEGF antagonists include, without limitation, anti-VEGF antibodies and antigen-binding fragments thereof, receptor molecules and derivatives which bind specifically to VEGF thereby sequestering its binding to one or more receptors, anti-VEGF receptor antibodies and VEGF receptor antagonists such as small molecule inhibitors of the VEGFR tyrosine kinases. The term "VEGF antagonist," as used herein, specifically includes molecules, including antibodies, antibody fragments, other binding polypeptides, peptides, and non-peptide small molecules, that bind to VEGF and are capable of neutralizing, blocking, inhibiting, abrogating, reducing or interfering with VEGF activities. Thus, the term "VEGF activities" specifically includes VEGF mediated biological activities (as hereinabove defined) of VEGF. In one embodiment, the VEGF-antagonist is anti-VEGF antibody B20-4.1.1. In yet another embodiment, the VEGF-antagonist is anti-VEGF antibody B20-4.1.1RR.

[00114] As used herein, "treatment" (and variations such as "treat" or "treating") refers to clinical intervention in an attempt to alter the natural course of the individual or cell being treated, and can be performed either for prophylaxis or during the course of clinical pathology. Desirable effects of treatment include preventing occurrence or recurrence of disease, alleviation of symptoms, diminishment of any direct or indirect pathological consequences of the disease, preventing metastasis, decreasing the rate of disease progression, amelioration or palliation of the disease state, and remission or improved prognosis. In some embodiments, antibodies of the invention are used to delay development of a disease or disorder or to slow the progression of a disease or disorder.

[00115] "Chronic" administration refers to administration of the agent(s) in a continuous mode as opposed to an acute mode, so as to maintain the initial therapeutic effect (activity) for an extended period of time. "Intermittent" administration is treatment that is not consecutively done without interruption, but rather is cyclic in nature.

[00116] A "disorder" is any condition that would benefit from treatment (for example, mammals who suffer from or need prophylaxis against abnormal angiogenesis (excessive, inappropriate or uncontrolled angiogenesis) or vascular permeability). This includes chronic and acute disorders or diseases including those pathological conditions, which predispose the mammal to the disorder in question. Non-limiting examples of disorders to be treated herein include malignant and benign tumors; non-leukemias and lymphoid malignancies; and, in particular, tumor (*e.g.*, cancer) metastasis.

[00117] The terms "cell proliferative disorder" and "proliferative disorder" refer to disorders that are associated with some degree of abnormal cell proliferation. In one embodiment, the cell proliferative disorder is cancer.

[00118] "Tumor," as used herein, refers to all neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues. The terms "cancer," "cancerous," "cell proliferative disorder," "proliferative disorder" and ""tumor" are not mutually exclusive as referred to herein.

[00119] The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma,

[00114] As used herein, "treatment" (and variations such as "treat" or "treating") refers to clinical intervention in an attempt to alter the natural course of the individual or cell being treated, and can be performed either for prophylaxis or during the course of clinical pathology. Desirable effects of treatment include preventing occurrence or recurrence of disease, alleviation of symptoms, diminishment of any direct or indirect pathological consequences of the disease, preventing metastasis, decreasing the rate of disease progression, amelioration or palliation of the disease state, and remission or improved prognosis. In some embodiments, antibodies of the invention are used to delay development of a disease or disorder or to slow the progression of a disease or disorder.

[00115] "Chronic" administration refers to administration of the agent(s) in a continuous mode as opposed to an acute mode, so as to maintain the initial therapeutic effect (activity) for an extended period of time. "Intermittent" administration is treatment that is not consecutively done without interruption, but rather is cyclic in nature.

[00116] A "disorder" is any condition that would benefit from treatment (for example, mammals who suffer from or need prophylaxis against abnormal angiogenesis (excessive, inappropriate or uncontrolled angiogenesis) or vascular permeability). This includes chronic and acute disorders or diseases including those pathological conditions, which predispose the mammal to the disorder in question. Non-limiting examples of disorders to be treated herein include malignant and benign tumors; non-leukemias and lymphoid malignancies; and, in particular, tumor (*e.g.*, cancer) metastasis.

[00117] The terms "cell proliferative disorder" and "proliferative disorder" refer to disorders that are associated with some degree of abnormal cell proliferation. In one embodiment, the cell proliferative disorder is cancer.

[00118] "Tumor," as used herein, refers to all neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues. The terms "cancer," "cancerous," "cell proliferative disorder," "proliferative disorder" and ""tumor" are not mutually exclusive as referred to herein.

[00119] The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma,

blastoma, sarcoma, and leukemia. More particular examples of such cancers include, but are not limited to, squamous cell cancer, lung cancer (including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung, and squamous carcinoma of the lung), cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer (including gastrointestinal cancer and gastrointestinal stromal cancer), pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, liver cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma and various types of head and neck cancer, melanoma, superficial spreading melanoma, lentigo maligna melanoma, acral lentiginous melanomas, nodular melanomas, as well as B-cell lymphoma (including low grade/follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL); small lymphocytic (SL) NHL; intermediate grade/follicular NHL; intermediate grade diffuse NHL; high grade immunoblastic NHL; high grade lymphoblastic NHL; high grade small non-cleaved cell NHL; bulky disease NHL; mantle cell lymphoma; AIDS-related lymphoma; and Waldenstrom's Macroglobulinemia); chronic lymphocytic leukemia (CLL); acute lymphoblastic leukemia (ALL); Hairy cell leukemia; chronic myeloblastic leukemia; and post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD), as well as abnormal vascular proliferation associated with phakomatoses, edema (such as that associated with brain tumors), and Meigs' syndrome.

[00120] An "individual," "subject," or "patient" is a vertebrate. In certain embodiments, the vertebrate is a mammal. Mammals include, but are not limited to, farm animals (such as cows), sport animals, pets (such as cats, dogs, and horses), primates, mice and rats. In certain embodiments, a mammal is a human.

[00121] The term "pharmaceutical formulation" refers to a preparation which is in such form as to permit the biological activity of the active ingredient to be effective, and which contains no additional components which are unacceptably toxic to a subject to which the formulation would be administered. Such formulations may be sterile.

[00122] A "sterile" formulation is aseptic or free from all living microorganisms and their spores.

[00123] An "effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired therapeutic or prophylactic result.

[00124] A "therapeutically effective amount" of a substance/molecule of the invention may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the substance/molecule, to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount encompasses an amount in which any toxic or detrimental effects of the substance/molecule are outweighed by the therapeutically beneficial effects. A "prophylactically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired prophylactic result. Typically, but not necessarily, since a prophylactic dose is used in subjects prior to or at an earlier stage of disease, the prophylactically effective amount would be less than the therapeutically effective amount.

[00125] Administration "in combination with" one or more further therapeutic agents includes simultaneous (concurrent) and consecutive administration in any order.

[00126] "Carriers" as used herein include pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers which are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the physiologically acceptable carrier is an aqueous pH buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptide; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN™, polyethylene glycol (PEG), and PLURONICS™.

[00127] A "liposome" is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids and/or surfactant which is useful for delivery of a drug (such as a VEGF polypeptide or antibody thereto) to a mammal. The components of the

liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes.

[00128] The term "anti-neoplastic composition" refers to a composition useful in treating cancer comprising at least one active therapeutic agent, *e.g.*, "anti-cancer agent." Examples of therapeutic agents (anti-cancer agents) include, but are limited to, *e.g.*, chemotherapeutic agents, growth inhibitory agents, cytotoxic agents, agents used in radiation therapy, anti-angiogenesis agents, apoptotic agents, anti-tubulin agents, and other-agents to treat cancer, such as anti-HER-2 antibodies, anti-CD20 antibodies, an epidermal growth factor receptor (EGFR) antagonist (*e.g.*, a tyrosine kinase inhibitor), HER1/EGFR inhibitor (*e.g.*, erlotinib (Tarceva™), platelet derived growth factor inhibitors (*e.g.*, Gleevec™ (Imatinib Mesylate)), a COX-2 inhibitor (*e.g.*, celecoxib), interferons, cytokines, antagonists (*e.g.*, neutralizing antibodies) that bind to one or more of the following targets ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA or VEGF receptor(s), TRAIL/Apo2, and other bioactive and organic chemical agents, etc. Combinations thereof are also included in the invention.

[00129] The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents a cellular function and/or causes cell death or destruction. The term is intended to include radioactive isotopes (*e.g.*, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} and radioactive isotopes of Lu), chemotherapeutic agents (*e.g.*, methotrexate, adriamicin, vinca alkaloids (vincristine, vinblastine, etoposide), doxorubicin, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, daunorubicin or other intercalating agents, enzymes and fragments thereof such as nucleolytic enzymes, antibiotics, and toxins such as small molecule toxins or enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, including fragments and/or variants thereof, and the various antitumor or anticancer agents disclosed below. Other cytotoxic agents are described below. A tumoricidal agent causes destruction of tumor cells.

[00130] A "toxin" is any substance capable of having a detrimental effect on the growth or proliferation of a cell.

[00131] A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and cyclosphosphamide (CYTOXAN®); alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone,

meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, triethylenephosphoramide, triethylenethiophosphoramide and trimethylomelamine; acetogenins (especially bullatacin and bullatacinone); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachone; lapachol; colchicines; betulinic acid; a camptothecin (including the synthetic analogue topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetylcamptothecin, scopolectin, and 9-aminocamptothecin); bryostatin; callystatin; CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin and bizelesin synthetic analogues); podophyllotoxin; podophyllinic acid; teniposide; cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8); dolastatin; duocarmycin (including the synthetic analogues, KW-2189 and CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; a sarcodictyin; spongistatin; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, chlorophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosoureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, and ranimnustine; antibiotics such as the enediyne antibiotics (*e.g.*, calicheamicin, especially calicheamicin gamma1I and calicheamicin omega1I (see, *e.g.*, Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, an oral alpha-4 integrin inhibitor; dynemicin, including dynemicin A; an esperamicin; as well as neocarzinostatin chromophore and related chromoprotein enediyne antibiotic chromophores), aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, carabicin, carminomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin (including ADRIAMYCIN®, morpholino-doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-doxorubicin, doxorubicin HCl liposome injection (DOXIL®), liposomal doxorubicin TLC D-99 (MYOCET®), peglylated liposomal doxorubicin (CAELYX®), and deoxydoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins such as mitomycin C, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, porfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate, gemcitabine (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabine (XELODA®), an epothilone, and 5-fluorouracil (5-FU); combretastatin; folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin,

trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiostane, testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; eniluracil; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elfornithine; elliptinium acetate; an epothilone; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidainine; maytansinoids such as maytansine and ansamitocins; mitoguazone; mitoxantrone; mopidanmol; nitraerine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; losoxantrone; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK® polysaccharide complex (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxane; rhizoxin; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2',2'-trichlorotriethylamine; trichothecenes (especially T-2 toxin, verracurin A, roridin A and anguidine); urethan; vindesine (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); thiotepa; taxoid, *e.g.*, paclitaxel (TAXOL®), albumin-engineered nanoparticle formulation of paclitaxel (ABRAXANE™), and docetaxel (TAXOTERE®); chloranbucil; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum agents such as cisplatin, oxaliplatin (*e.g.*, ELOXATIN®), and carboplatin; vincas, which prevent tubulin polymerization from forming microtubules, including vinblastine (VELBAN®), vincristine (ONCOVIN®), vindesine (ELDISINE®, FILDESIN®), and vinorelbine (NAVELBINE®); etoposide (VP-16); ifosfamide; mitoxantrone; leucovorin; novantrone; edatrexate; daunomycin; aminopterin; ibandronate; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoids such as retinoic acid, including bexarotene (TARGRETIN®); bisphosphonates such as clodronate (for example, BONEFOS® or OSTAC®), etidronate (DIDROCAL®), NE-58095, zoledronic acid/zoledronate (ZOMETA®), alendronate (FOSAMAX®), pamidronate (AREDIA®), tiludronate (SKELID®), or risedronate (ACTONEL®); troxacitabine (a 1,3-dioxolane nucleoside cytosine analog); antisense oligonucleotides, particularly those that inhibit expression of genes in signaling pathways implicated in aberrant cell proliferation, such as, for example, PKC-alpha, Raf, H-Ras, and epidermal growth factor receptor (EGF-R) (*e.g.*, erlotinib

(Tarceva™)); and VEGF-A that reduce cell proliferation; vaccines such as THERATOPE® vaccine and gene therapy vaccines, for example, ALLOVECTIN® vaccine, LEUVECTIN® vaccine, and VAXID® vaccine; topoisomerase 1 inhibitor (*e.g.*, LURTOTECAN®); rmRH (*e.g.*, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosine, COX-2 inhibitor (*e.g.*, celecoxib or etoricoxib), proteosome inhibitor (*e.g.*, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; Bcl-2 inhibitor such as oblimersen sodium (GENASENSE®); pixantrone; EGFR inhibitors; tyrosine kinase inhibitors; serine-threonine kinase inhibitors such as rapamycin (sirolimus, RAPAMUNE®); farnesyltransferase inhibitors such as lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above; as well as combinations of two or more of the above such as CHOP, an abbreviation for a combined therapy of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone; and FOLFOX, an abbreviation for a treatment regimen with oxaliplatin (ELOXATIN™) combined with 5-FU and leucovorin, and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above; as well as combinations of two or more of the above.

[00132] Chemotherapeutic agents as defined herein include "anti-hormonal agents" or "endocrine therapeutics" which act to regulate, reduce, block, or inhibit the effects of hormones that can promote the growth of cancer. They may be hormones themselves, including, but not limited to: anti-estrogens and selective estrogen receptor modulators (SERMs), including, for example, tamoxifen (including NOLVADEX® tamoxifen), raloxifene, droloxifene, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and FARESTON· toremifene; aromatase inhibitors that inhibit the enzyme aromatase, which regulates estrogen production in the adrenal glands, such as, for example, 4(5)-imidazoles, aminoglutethimide, MEGASE® megestrol acetate, AROMASIN® exemestane, formestanie, fadrozole, RIVISOR® vorozole, FEMARA® letrozole, and ARIMIDEX® anastrozole; and anti-androgens such as flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; as well as troxacitabine (a 1,3-dioxolane nucleoside cytosine analog); antisense oligonucleotides, particularly those which inhibit expression of genes in signaling pathways implicated in abherant cell proliferation, such as, for example, PKC-alpha, Raf and H-Ras; ribozymes such as a VEGF expression inhibitor (*e.g.*,

ANGIOZYME® ribozyme) and a HER2 expression inhibitor; vaccines such as gene therapy vaccines, for example, ALLOVECTIN® vaccine, LEUVECTIN® vaccine, and VAXID® vaccine; PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN® topoisomerase 1 inhibitor; ABARELIX® rmRH; Vinorelbine and Esperamicins (see U.S. Patent No. 4,675,187), and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above; as well as combinations of two or more of the above.

[00133] A "growth inhibitory agent" when used herein refers to a compound or composition which inhibits growth of a cell (such as a cell expressing VEGF) either in vitro or in vivo. Thus, the growth inhibitory agent may be one which significantly reduces the percentage of cells (such as a cell expressing VEGF) in S phase. Examples of growth inhibitory agents include agents that block cell cycle progression (at a place other than S phase), such as agents that induce G1 arrest and M-phase arrest. Classical M-phase blockers include the vincas (vincristine and vinblastine), taxanes, and topoisomerase II inhibitors such as doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposide, and bleomycin. Those agents that arrest G1 also spill over into S-phase arrest, for example, DNA alkylating agents such as tamoxifen, prednisone, dacarbazine, mechlorethamine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil, and ara-C. Further information can be found in Mendelsohn and Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami *et al.* (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), *e.g.*, p. 13. The taxanes (paclitaxel and docetaxel) are anticancer drugs both derived from the yew tree. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derived from the European yew, is a semisynthetic analogue of paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel and docetaxel promote the assembly of microtubules from tubulin dimers and stabilize microtubules by preventing depolymerization, which results in the inhibition of mitosis in cells.

[00134] The "pathology" of a disease includes all phenomena that compromise the well-being of the patient. For cancer, this includes, without limitation, abnormal or uncontrollable cell growth, metastasis, interference with the normal functioning of neighboring cells, release of cytokines or other secretory products at abnormal levels, suppression or aggravation of inflammatory or immunological response, etc.

[00135] The term "prodrug" as used in this application refers to a precursor or derivative form of a pharmaceutically active substance that is less cytotoxic to tumor cells compared to the parent drug and is capable of being enzymatically activated or converted into the more active parent form. See, *e.g.*, Wilman (1986) "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast and Stella et al. (1985). "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press. The prodrugs of this invention include, but are not limited to, phosphate-containing prodrugs, thiophosphate-containing prodrugs, sulfate-containing prodrugs, peptide-containing prodrugs, D-amino acid-modified prodrugs, glycosylated prodrugs, β-lactam-containing prodrugs, optionally substituted phenoxyacetamide-containing prodrugs or optionally substituted phenylacetamide-containing prodrugs, 5-fluorocytosine and other 5-fluorouridine prodrugs which can be converted into the more active cytotoxic free drug. Examples of cytotoxic drugs that can be derivatized into a prodrug form for use in this invention include, but are not limited to, those chemotherapeutic agents described above.

[00136] A "small molecule" is defined herein to have a molecular weight below about 500 Daltons.

[00137] "Purified" means that a molecule is present in a sample at a concentration of at least 95% by weight, or at least 98% by weight of the sample in which it is contained.

[00138] An "isolated" nucleic acid molecule is a nucleic acid molecule that is separated from at least one other nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated, for example, in its natural environment. An isolated nucleic acid molecule further includes a nucleic acid molecule contained in cells that ordinarily express the nucleic acid molecule, but the nucleic acid molecule is present extrachromosomally or at a chromosomal location that is different from its natural chromosomal location.

[00139] The term "vector," as used herein, is intended to refer to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid," which refers to a circular double stranded DNA into which additional DNA segments may be ligated. Another type of vector is a phage vector. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of

autonomous replication in a host cell into which they are introduced (*e.g.*, bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (*e.g.*, non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors," or simply, "expression vectors." In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" may be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector.

[00140] "Polynucleotide," or "nucleic acid," as used interchangeably herein, refer to polymers of nucleotides of any length, and include DNA and RNA. The nucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, modified nucleotides or bases, and/or their analogs, or any substrate that can be incorporated into a polymer by DNA or RNA polymerase or by a synthetic reaction. A polynucleotide may comprise modified nucleotides, such as methylated nucleotides and their analogs. If present, modification to the nucleotide structure may be imparted before or after assembly of the polymer. The sequence of nucleotides may be interrupted by non-nucleotide components. A polynucleotide may comprise modification(s) made after synthesis, such as conjugation to a label. Other types of modifications include, for example, "caps," substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, internucleotide modifications such as, for example, those with uncharged linkages (*e.g.*, methyl phosphonates, phosphotriesters, phosphoamidates, carbamates, etc.) and with charged linkages (*e.g.*, phosphorothioates, phosphorodithioates, etc.), those containing pendant moieties, such as, for example, proteins (*e.g.*, nucleases, toxins, antibodies, signal peptides, ply-L-lysine, etc.), those with intercalators (*e.g.*, acridine, psoralen, etc.), those containing chelators (*e.g.*, metals, radioactive metals, boron, oxidative metals, etc.), those containing alkylators, those with modified linkages (*e.g.*, alpha anomeric nucleic acids, etc.), as well as unmodified forms of the polynucleotides(s). Further, any of the hydroxyl groups ordinarily present in the sugars may be replaced, for example, by phosphonate groups, phosphate groups, protected by standard protecting groups, or activated to prepare additional linkages to additional nucleotides, or may be conjugated to solid or semi-

solid supports. The 5' and 3' terminal OH can be phosphorylated or substituted with amines or organic capping group moieties of from 1 to 20 carbon atoms. Other hydroxyls may also be derivatized to standard protecting groups. Polynucleotides can also contain analogous forms of ribose or deoxyribose sugars that are generally known in the art, including, for example, 2'-O-methyl-, 2'-O-allyl-, 2'-fluoro- or 2'-azido-ribose, carbocyclic sugar analogs, α-anomeric sugars, epimeric sugars such as arabinose, xyloses or lyxoses, pyranose sugars, furanose sugars, sedoheptuloses, acyclic analogs, and basic nucleoside analogs such as methyl riboside. One or more phosphodiester linkages may be replaced by alternative linking groups. These alternative linking groups include, but are not limited to, embodiments wherein phosphate is replaced by P(O)S ("thioate"), P(S)S ("dithioate"), (O)NR_2 ("amidate"), P(O)R, P(O)OR', CO, or CH2 ("formacetal"), in which each R or R' is independently H or substituted or unsubstituted alkyl (1-20 C) optionally containing an ether (-O-) linkage, aryl, alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl or araldyl. Not all linkages in a polynucleotide need be identical. The preceding description applies to all polynucleotides referred to herein, including RNA and DNA.

[00141] "Oligonucleotide," as used herein, generally refers to short, generally single-stranded, generally synthetic polynucleotides that are generally, but not necessarily, less than about 200 nucleotides in length. The terms "oligonucleotide" and "polynucleotide" are not mutually exclusive. The description above for polynucleotides is equally and fully applicable to oligonucleotides.

[00142] "Percent (%) amino acid sequence identity" with respect to a reference polypeptide sequence is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in the reference polypeptide sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for aligning sequences, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid

sequence identity values are generated using the sequence comparison computer program ALIGN-2. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc., and the source code has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available from Genentech, Inc., South San Francisco, California, or may be compiled from the source code. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

[00143] In situations where ALIGN-2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

100 times the fraction X/Y,

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A. Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described in the immediately preceding paragraph using the ALIGN-2 computer program.

[00144] The expression "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

[00145] Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is

expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

[00146] As used herein, the expressions "cell," "cell line," and "cell culture" are used interchangeably and all such designations include progeny. Thus, the words "transformants" and "transformed cells" include the primary subject cell and cultures derived therefrom without regard for the number of transfers. It is also understood that all progeny may not be precisely identical in DNA content, due to deliberate or inadvertent mutations. Mutant progeny that have the same function or biological activity as screened for in the originally transformed cell are included. Where distinct designations are intended, it will be clear from the context.

[00147] The term "concurrently" is used herein to refer to administration of two or more therapeutic agents, where at least part of the administration overlaps in time. Accordingly, concurrent administration includes a dosing regimen when the administration of one or more agent(s) continues after discontinuing the administration of one or more other agent(s).

[00148] "Cancer recurrence" herein refers to a return of cancer following treatment. In one embodiment, cancer recurrence includes return of cancer in the breast, as well as distant recurrence, where the cancer returns outside of the breast.

Compositions of the invention

[00149] The invention encompasses isolated antibody and polynucleotide embodiments. In one embodiment, an anti-VEGF antibody is purified.

[00150] This invention also encompasses compositions, including pharmaceutical compositions, comprising an anti-VEGF antibody; and polynucleotides comprising sequences encoding an anti-VEGF antibody. As used herein, compositions comprise one or more antibodies that bind to VEGF, and/or one

or more polynucleotides comprising sequences encoding one or more antibodies that bind to VEGF. These compositions may further comprise suitable carriers, such as pharmaceutically acceptable excipients including buffers, which are well known in the art.

[00151] In one embodiment, the anti-VEGF antibodies of the invention are monoclonal. In yet another embodiment, the anti-VEGF antibodies are polyclonal. Also encompassed within the scope of the invention are Fab, Fab', Fab'-SH and $F(ab')_2$ fragments of the anti-VEGF antibodies provided herein. These antibody fragments can be created by traditional means, such as enzymatic digestion, or may be generated by recombinant techniques. Such antibody fragments may be chimeric or humanized. These fragments are useful for the diagnostic and purposes set forth below. In one embodiment, an anti-VEGF antibody is a chimeric, humanized, or human antibody.

[00152] Monoclonal antibodies are obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Thus, the modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as not being a mixture of discrete antibodies.

[00153] Exemplary monoclonal antibodies derived from a phage library are provided herein and described in Example 1. Those antibodies are designated B20-4.1.1 and B20-4.1.1RR. The sequences of the heavy and light chain variable domains of B20-4.1.1 and B20-4.1.1RR are shown in Figures 1 and 6-9.

[00154] To screen for antibodies which bind to a particular epitope on the antigen of interest, a routine cross-blocking assay such as that described in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), can be performed. Alternatively, epitope mapping, *e.g.*, as described in Champe *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394, can be performed to determine whether the antibody binds an epitope of interest. Further exemplary embodiments of anti-VEGF antibodies are provided below.

Specific embodiments of anti-VEGF antibodies

[00155] In one embodiment, the invention provides an antibody comprising:

(i) a HVR-H1 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:1;

(ii) a HVR-H2 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:2;

(iii) a HVR-H3 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:3.

(iv) a HVR-L1 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:4.

(v) a HVR-L2 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:6.

(vi) a HVR-L3 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:7.

[00156] In another embodiment, the invention provides an antibody comprising:

(i) a HVR-H1 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:1;

(ii) a HVR-H2 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:2;

(iii) a HVR-H3 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:3.

(iv) a HVR-L1 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:5.

(v) a HVR-L2 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:6.

(vi) a HVR-L3 sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:7.

[00157] The amino acid sequences of SEQ ID NOs:1 to 7 are numbered with respect to individual HVR (i.e., H1, H2 or H3) as indicated in Figure 1, the numbering being consistent with the Kabat numbering system as described herein.

[00158] In one aspect, the invention provides antibodies comprising heavy chain HVR sequences as depicted in Figure 1.

[00159] Some embodiments of antibodies of the invention comprise a light chain variable domain of humanized 4D5 antibody (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (also referred to in U.S. Patent No. 6,407,213 and Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93) as depicted in SEQ ID NO:39 below.

[00160] [1]Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val ***Asn*** Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser ***Arg*** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln ***His*** Tyr Thr Thr Pro Pro

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys[107] (SEQ ID NO:39) (HVR residues are underlined).

[00161] In one embodiment, the huMAb4D5-8 light chain variable domain sequence is modified at one or more of positions 30, 66 and 91 (Asn, Arg and His as indicated in bold/italics above, respectively). In one embodiment, the modified huMAb4D5-8 sequence comprises Ser in position 30, Gly in position 66 and/or Ser in position 91. Accordingly, in one embodiment, an antibody of the invention comprises a light chain variable domain comprising the sequence depicted in SEQ ID NO:40 below:

[00162] [1]Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val ***Ser*** Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser ***Gly*** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln ***Ser*** Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys[107] (SEQ ID NO:40) (HVR residues are underlined)

[00163] Substituted residues with respect to huMAb4D5-8 are indicated in bold/italics above.

[00164] Antibodies of the invention can comprise any suitable framework variable domain sequence, provided binding activity to VEGF is substantially retained. For example, in some embodiments, antibodies of the invention comprise a human subgroup III heavy chain framework consensus sequence. In one embodiment of these antibodies, the framework consensus sequence comprises substitution at position 71, 73 and/or 78. In some embodiments of these antibodies, position 71 is A, 73 is T and/or 78 is A. In one embodiment, these antibodies comprise heavy chain variable domain framework sequences of huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (also referred to in U.S. Patent Nos. 6,407,213 & 5,821,337, and Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93). In one embodiment, these antibodies further comprise a human κI light chain framework consensus sequence. In one embodiment, these antibodies comprise light chain HVR sequences of huMAb4D5-8 as described in U.S. Pat. Nos. 6,407,213 & 5,821,337). In one embodiment, these antibodies comprise light chain variable domain sequences of huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA)

(also referred to in U.S. Patent Nos. 6,407,213 & 5,821,337, and Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93).

[00165] In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain, wherein the framework sequence comprises the sequences of SEQ ID NOS:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, and/or 26 (Figures 2a and 2b), and HVR H1, H2 and H3 sequences are SEQ ID NOS:1, 2 and/or 3, respectively. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a light chain variable domain, wherein the framework sequence comprises the sequences of SEQ ID NOS:27, 28, 29 and/or 30 (Figure 3), HVR L1 sequence is SEQ ID NOS:4 or 5, HVR L2 sequence is SEQ ID NO:6, and HVR L3 sequence is SEQ ID NO:7.

[00166] In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:43. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a light chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:44 or 45. In one embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:43 and a light chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:45. In yet another embodiment, an antibody of the invention comprises a heavy chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:44 and a light chain variable domain comprising the sequence of SEQ ID NO:45.

[00167] In one aspect, the invention provides an antibody that competes with any of the above-mentioned antibodies for binding to VEGF. In one aspect, the invention provides an antibody that binds to the same epitope on VEGF as any of the above-mentioned antibodies.

Antibody Fragments

[00168] The present invention encompasses antibody fragments. Antibody fragments may be generated by traditional means, such as enzymatic digestion, or by recombinant techniques. In certain circumstances there are advantages of using antibody fragments, rather than whole antibodies. The smaller size of the fragments allows for rapid clearance, and may lead to improved access to solid tumors. For a review of certain antibody fragments, see Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

[00169] Various techniques have been developed for the production of antibody fragments. Traditionally, these fragments were derived via proteolytic digestion of intact antibodies (see, *e.g.*, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); and Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). However, these fragments can now be produced directly by recombinant host cells. Fab, Fv and ScFv antibody fragments can all be expressed in and secreted from *E. coli*, thus allowing the facile production of large amounts of these fragments. Antibody fragments can be isolated from the antibody phage libraries discussed above. Alternatively, Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form $F(ab')_2$ fragments (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). According to another approach, $F(ab')_2$ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Fab and $F(ab')_2$ fragment with increased in vivo half-life comprising salvage receptor binding epitope residues are described in U.S. Patent No. 5,869,046. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the skilled practitioner. In certain embodiments, an antibody is a single chain Fv fragment (scFv). See WO 93/16185; U.S. Patent Nos. 5,571,894; and 5,587,458. Fv and scFv are the only species with intact combining sites that are devoid of constant regions; thus, they may be suitable for reduced nonspecific binding during in vivo use. scFv fusion proteins may be constructed to yield fusion of an effector protein at either the amino or the carboxy terminus of an scFv. See *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, supra. The antibody fragment may also be a "linear antibody", *e.g.*, as described in U.S. Patent No. 5,641,870, for example. Such linear antibodies may be monospecific or bispecific.

Humanized Antibodies

[00170] The invention encompasses humanized antibodies. Various methods for humanizing non-human antibodies are known in the art. For example, a humanized antibody can have one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536), by

substituting hypervariable region sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567) wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some hypervariable region residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

[00171] The choice of human variable domains, both light and heavy, to be used in making the humanized antibodies can be important to reduce antigenicity. According to the so-called "best-fit" method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody is screened against the entire library of known human variable-domain sequences. The human sequence which is closest to that of the rodent is then accepted as the human framework for the humanized antibody. See, *e.g.*, Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Another method uses a particular framework derived from the consensus sequence of all human antibodies of a particular subgroup of light or heavy chains. The same framework may be used for several different humanized antibodies. See, *e.g.*, Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2623.

[00172] It is further generally desirable that antibodies be humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to one method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, *i.e.*, the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the hypervariable

region residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

Human Antibodies

[00173] Human antibodies of the invention can be constructed by combining Fv clone variable domain sequence(s) selected from human-derived phage display libraries with known human constant domain sequences(s) as described above. Alternatively, human monoclonal antibodies of the invention can be made by the hybridoma method. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines for the production of human monoclonal antibodies have been described, for example, by Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); and Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

[00174] It is now possible to produce transgenic animals (*e.g.*, mice) that are capable, upon immunization, of producing a full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy-chain joining region (JH) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array in such germ-line mutant mice will result in the production of human antibodies upon antigen challenge. See, *e.g.*, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A,* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature,* 362: 255 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immunol.,* 7: 33 (1993).

[00175] Gene shuffling can also be used to derive human antibodies from non-human, *e.g.* rodent, antibodies, where the human antibody has similar affinities and specificities to the starting non-human antibody. According to this method, which is also called "epitope imprinting," either the heavy or light chain variable region of a non-human antibody fragment obtained by phage display techniques as described herein is replaced with a repertoire of human V domain genes, creating a population of non-human chain/human chain scFv or Fab chimeras. Selection with antigen results in isolation of a non-human chain/human chain chimeric scFv or Fab wherein the human chain restores the antigen binding site destroyed upon removal of the corresponding non-human chain in the primary phage display clone, i.e. the

epitope governs (imprints) the choice of the human chain partner. When the process is repeated in order to replace the remaining non-human chain, a human antibody is obtained (see PCT WO 93/06213 published April 1, 1993). Unlike traditional humanization of non-human antibodies by CDR grafting, this technique provides completely human antibodies, which have no FR or CDR residues of non-human origin.

Bispecific Antibodies

[00176] Bispecific antibodies are monoclonal antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In certain embodiments, bispecific antibodies are human or humanized antibodies. In certain embodiments, one of the binding specificities is for VEGF and the other is for any other antigen. In certain embodiments, bispecific antibodies may bind to two different epitopes of VEGF. Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells which express VEGF. These antibodies possess a VEGF-binding arm and an arm which binds a cytotoxic agent, such as, *e.g.*, saporin, anti-interferon-α, vinca alkaloid, ricin A chain, methotrexate or radioactive isotope hapten. Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (*e.g.*, $F(ab')_2$ bispecific antibodies).

[00177] Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two heavy chains have different specificities (Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of 10 different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829 published May 13, 1993, and in Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

[00178] According to a different approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion, for example, is with an

immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. In certain embodiments, the first heavy-chain constant region (CH1), containing the site necessary for light chain binding, is present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

[00179] In one embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile way of separation. This approach is disclosed in WO 94/04690. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al., Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

[00180] According to another approach, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The interface comprises at least a part of the C_H3 domain of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (*e.g.*, tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (*e.g.*, alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

[00181] Bispecific antibodies include cross-linked or "heteroconjugate" antibodies. For example, one of the antibodies in the heteroconjugate can be coupled to avidin, the other to biotin. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (WO 91/00360, WO 92/00373, and EP 03089). Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking method. Suitable cross-linking agents are well known in the art, and are disclosed in U.S. Patent No. 4,676,980, along with a number of cross-linking techniques.

[00182] Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have also been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al., Science*, 229: 81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate $F(ab')_2$ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

[00183] Recent progress has facilitated the direct recovery of Fab'-SH fragments from *E. coli,* which can be chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al., J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody $F(ab')_2$ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the HER2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

[00184] Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny *et al., J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos

and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (VH) connected to a light-chain variable domain (VL) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the VH and VL domains of one fragment are forced to pair with the complementary VL and VH domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See Gruber *et al., J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

[00185] Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt *et al. J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Multivalent Antibodies

[00186] A multivalent antibody may be internalized (and/or catabolized) faster than a bivalent antibody by a cell expressing an antigen to which the antibodies bind. The antibodies of the present invention can be multivalent antibodies (which are other than of the IgM class) with three or more antigen binding sites (*e.g.*, tetravalent antibodies), which can be readily produced by recombinant expression of nucleic acid encoding the polypeptide chains of the antibody. The multivalent antibody can comprise a dimerization domain and three or more antigen binding sites. In certain embodiments, the dimerization domain comprises (or consists of) an Fc region or a hinge region. In this scenario, the antibody will comprise an Fc region and three or more antigen binding sites amino-terminal to the Fc region. In certain embodiments, a multivalent antibody comprises (or consists of) three to about eight antigen binding sites. In one such embodiment, a multivalent antibody comprises (or consists of) four antigen binding sites. The multivalent antibody comprises at least one polypeptide chain (for example, two polypeptide chains), wherein the polypeptide chain(s) comprise two or more variable domains. For instance, the polypeptide

chain(s) may comprise VD1-(X1)n -VD2-(X2)n -Fc, wherein VD1 is a first variable domain, VD2 is a second variable domain, Fc is one polypeptide chain of an Fc region, X1 and X2 represent an amino acid or polypeptide, and n is 0 or 1. For instance, the polypeptide chain(s) may comprise: VH-CH1-flexible linker-VH-CH1-Fc region chain; or VH-CH1-VH-CH1-Fc region chain. The multivalent antibody herein may further comprise at least two (for example, four) light chain variable domain polypeptides. The multivalent antibody herein may, for instance, comprise from about two to about eight light chain variable domain polypeptides. The light chain variable domain polypeptides contemplated here comprise a light chain variable domain and, optionally, further comprise a CL domain.

Single-Domain Antibodies

[00187] In some embodiments, an antibody of the invention is a single-domain antibody. A single-domain antibody is a single polyeptide chain comprising all or a portion of the heavy chain variable domain or all or a portion of the light chain variable domain of an antibody. In certain embodiments, a single-domain antibody is a human single-domain antibody (Domantis, Inc., Waltham, MA; see, *e.g.*, U.S. Patent No. 6,248,516 B1). In one embodiment, a single-domain antibody consists of all or a portion of the heavy chain variable domain of an antibody.

Antibody Variants

[00188] In some embodiments, amino acid sequence modification(s) of the antibodies described herein are contemplated. For example, it may be desirable to improve the binding affinity and/or other biological properties of the antibody. Amino acid sequence variants of the antibody may be prepared by introducing appropriate changes into the nucleotide sequence encoding the antibody, or by peptide synthesis. Such modifications include, for example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of, residues within the amino acid sequences of the antibody. Any combination of deletion, insertion, and substitution can be made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. The amino acid alterations may be introduced in the subject antibody amino acid sequence at the time that sequence is made.

[00189] A useful method for identification of certain residues or regions of the antibody that are preferred locations for mutagenesis is called "alanine scanning mutagenesis" as described by Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Here, a residue or group of target residues are identified (*e.g.*, charged residues such as Arg, Asp, His, Lys, and Glu) and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (*e.g.*, alanine or polyalanine) to affect the interaction of the amino acids with antigen. Those amino acid locations demonstrating functional sensitivity to the substitutions then are refined by introducing further or other variants at, or for, the sites of substitution. Thus, while the site for introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the nature of the mutation *per se* need not be predetermined. For example, to analyze the performance of a mutation at a given site, ala scanning or random mutagenesis is conducted at the target codon or region and the expressed immunoglobulins are screened for the desired activity.

[00190] Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an antibody with an N-terminal methionyl residue. Other insertional variants of the antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the antibody to an enzyme (*e.g.*, for ADEPT) or a polypeptide which increases the serum half-life of the antibody.

[00191] In certain embodiments, an antibody of the invention is altered to increase or decrease the extent to which the antibody is glycosylated. Glycosylation of polypeptides is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of a carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine and asparagine-X-threonine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-aceylgalactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

[00192] Addition or deletion of glycosylation sites to the antibody is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that one or more

of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites) is created or removed. The alteration may also be made by the addition, deletion, or substitution of one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antibody (for O-linked glycosylation sites).

[00193] Where the antibody comprises an Fc region, the carbohydrate attached thereto may be altered. Native antibodies produced by mammalian cells typically comprise a branched, biantennary oligosaccharide that is generally attached by an N-linkage to Asn297 of the CH2 domain of the Fc region. See, *e.g.*, Wright *et al.* (1997) *TIBTECH* 15:26-32. The oligosaccharide may include various carbohydrates, *e.g.*, mannose, N-acetyl glucosamine (GlcNAc), galactose, and sialic acid, as well as a fucose attached to a GlcNAc in the "stem" of the biantennary oligosaccharide structure. In some embodiments, modifications of the oligosaccharide in an antibody of the invention may be made in order to create antibody variants with certain improved properties.

[00194] For example, antibody variants are provided having a carbohydrate structure that lacks fucose attached (directly or indirectly) to an Fc region. Such variants may have improved ADCC function. See, *e.g.*, U.S. Patent Publication Nos. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Examples of publications related to "defucosylated" or "fucose-deficient" antibody variants include: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Examples of cell lines capable of producing defucosylated antibodies include Lec13 CHO cells deficient in protein fucosylation (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US 2003/0157108 A1, Presta, L; and WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especially at Example 11), and knockout cell lines, such as alpha-1,6-fucosyltransferase gene, *FUT8,* knockout CHO cells (see, *e.g.*, Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al., Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); and WO2003/085107).

[00195] Antibodies variants are further provided with bisected oligosaccharides, *e.g.*, in which a biantennary oligosaccharide attached to the Fc region of the antibody is bisected by GlcNAc. Such antibody variants may have reduced fucosylation and/or improved ADCC function. Examples of such antibody variants are described, *e.g.*, in WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); U.S. Patent No. 6,602,684 (Umana *et al.*); and US 2005/0123546 (Umana *et al.*). Antibody variants with at least one galactose residue in the oligosaccharide attached to the Fc region are also provided. Such antibody variants may have improved CDC function. Such antibody variants are described, *e.g.*, in WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); and WO 1999/22764 (Raju, S.).

[00196] In certain embodiments, an antibody variant comprises an Fc region with one or more amino acid substitutions which further improve ADCC, for example, substitutions at positions 298, 333, and/or 334 of the Fc region (Eu numbering of residues). Such substitutions may occur in combination with any of the variations described above.

[00197] In certain embodiments, the invention contemplates an antibody variant that possesses some but not all effector functions, which make it a desirable candidate for many applications in which the half life of the antibody *in vivo* is important yet certain effector functions (such as complement and ADCC) are unnecessary or deleterious. In certain embodiments, the Fc activities of the antibody are measured to ensure that only the desired properties are maintained. *In vitro* and/or *in vivo* cytotoxicity assays can be conducted to confirm the reduction/depletion of CDC and/or ADCC activities. For example, Fc receptor (FcR) binding assays can be conducted to ensure that the antibody lacks FcγR binding (hence likely lacking ADCC activity), but retains FcRn binding ability. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express FcγRIII only, whereas monocytes express FcγRI, FcγRII and FcγRIII. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Non-limiting examples of *in vitro* assays to assess ADCC activity of a molecule of interest is described in U.S. Patent No. 5,500,362 (see, *e.g.* Hellstrom, I., *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) and Hellstrom, I *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (see Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Alternatively, non-radioactive assays methods may be employed (see,

for example, ACTI™ non-radioactive cytotoxicity assay for flow cytometry (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; and CytoTox 96® non-radioactive cytotoxicity assay (Promega, Madison, WI). Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, *e.g.*, in a animal model such as that disclosed in Clynes *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). C1q binding assays may also be carried out to confirm that the antibody is unable to bind C1q and hence lacks CDC activity. To assess complement activation, a CDC assaymay be performed (see, for example, Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al.*, *Blood* 101:1045-1052 (2003); and Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). FcRn binding and *in vivo* clearance/half life determinations can also be performed using methods known in the art (see, for example, Petkova, S.B. *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

[00198] Other antibody variants having one or more amino acid substitutions are provided. Sites of interest for substitutional mutagenesis include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 1 under the heading of "preferred substitutions." More substantial changes, denominated "exemplary substitutions" are provided in Table 1, or as further described below in reference to amino acid classes. Amino acid substitutions may be introduced into an antibody of interest and the products screened, *e.g.*, for a desired activity, such as improved antigen binding, decreased immunogenicity, improved ADCC or CDC, etc.

TABLE 1

Original Residue	**Exemplary Substitutions**	**Preferred Substitutions**
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

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
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; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; 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; Norleucine	Leu

[00199] Modifications in the biological properties of an antibody may be accomplished by selecting substitutions that affect (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Amino acids may be grouped according to similarities in the properties of their side chains (in A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) non-polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M).

(2) uncharged polar: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) acidic: Asp (D), Glu (E)

(4) basic: Lys (K), Arg (R), His(H)

Alternatively, naturally occurring residues may be divided into groups based on common side-chain properties:

(1) hydrophobic: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) acidic: Asp, Glu;

(4) basic: His, Lys, Arg;

(5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro;

(6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

[00200] Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class. Such substituted residues also may be introduced into the conservative substitution sites or, into the remaining (*e.g.*, non-conserved) sites.

[00201] One type of substitutional variant involves substituting one or more hypervariable region residues of a parent antibody (*e.g.*, a humanized or human antibody). Generally, the resulting variant(s) selected for further development will have modified (*e.g.*, improved) biological properties relative to the parent antibody from which they are generated. An exemplary substitutional variant is an affinity matured antibody, which may be conveniently generated using phage display-based affinity maturation techniques. Briefly, several hypervariable region sites (*e.g.*, 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino acid substitutions at each site. The antibodies thus generated are displayed from filamentous phage particles as fusions to at least part of a phage coat protein (*e.g.*, the gene III product of M13) packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (*e.g.*, binding affinity). In order to identify candidate hypervariable region sites for modification, scanning mutagenesis (*e.g.*, alanine scanning) can be performed to identify hypervariable region residues contributing significantly to antigen binding. Alternatively, or additionally, it may be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and antigen. Such contact residues and neighboring residues are

candidates for substitution according to techniques known in the art, including those elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening using techniques known in the art, including those described herein, and variants with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

[00202] Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the antibody are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or a non-variant version of the antibody.

[00203] It may be desirable to introduce one or more amino acid modifications in an Fc region of antibodies of the invention, thereby generating an Fc region variant. The Fc region variant may comprise a human Fc region sequence (*e.g.*, a human IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 Fc region) comprising an amino acid modification (*e.g.*, a substitution) at one or more amino acid positions including that of a hinge cysteine.

[00204] In accordance with this description and the teachings of the art, it is contemplated that in some embodiments, an antibody of the invention may comprise one or more alterations as compared to the wild type counterpart antibody, *e.g.*, in the Fc region. These antibodies would nonetheless retain substantially the same characteristics required for therapeutic utility as compared to their wild type counterpart. For example, it is thought that certain alterations can be made in the Fc region that would result in altered (*i.e.*, either improved or diminished) C1q binding and/or Complement Dependent Cytotoxicity (CDC), *e.g.*, as described in WO99/51642. See also Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); U.S. Patent No. 5,648,260; U.S. Patent No. 5,624,821; and WO94/29351 concerning other examples of Fc region variants. WO00/42072 (Presta) and WO 2004/056312 (Lowman) describe antibody variants with improved or diminished binding to FcRs. The content of these patent publications are specifically incorporated herein by reference. See, also, Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Antibodies with increased half lives and improved binding to the neonatal Fc receptor (FcRn), which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer *et*

al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), are described in US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). These antibodies comprise an Fc region with one or more substitutions therein which improve binding of the Fc region to FcRn. Polypeptide variants with altered Fc region amino acid sequences and increased or decreased C1q binding capability are described in US Patent No. 6,194,551B1, WO99/51642. The contents of those patent publications are specifically incorporated herein by reference. See, also, Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

[00205] In another aspect, the invention provides antibodies comprising modifications in the interface of Fc polypeptides comprising the Fc region, wherein the modifications facilitate and/or promote heterodimerization. These modifications comprise introduction of a protuberance into a first Fc polypeptide and a cavity into a second Fc polypeptide, wherein the protuberance is positionable in the cavity so as to promote complexing of the first and second Fc polypeptides. Methods of generating antibodies with these modifications are known in the art, *e.g.*, as described in U.S. Patent No. 5,731,168.

[00206] In yet another aspect, it may be desirable to create cysteine engineered antibodies, *e.g.*, "thioMAbs," in which one or more residues of an antibody are substituted with cysteine residues. In particular embodiments, the substituted residues occur at accessible sites of the antibody. By substituting those residues with cysteine, reactive thiol groups are thereby positioned at accessible sites of the antibody and may be used to conjugate the antibody to other moieties, such as drug moieties or linker-drug moieties, as described further herein. In certain embodiments, any one or more of the following residues may be substituted with cysteine: V205 (Kabat numbering) of the light chain; A118 (EU numbering) of the heavy chain; and S400 (EU numbering) of the heavy chain Fc region.

Antibody Derivatives

[00207] The antibodies of the present invention can be further modified to contain additional nonproteinaceous moieties that are known in the art and readily available. Preferably, the moieties suitable for derivatization of the antibody are water soluble polymers. Non-limiting examples of water soluble polymers include, but are not limited to, polyethylene glycol (PEG), copolymers of ethylene

glycol/propylene glycol, carboxymethylcellulose, dextran, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, poly-1, 3-dioxolane, poly-1,3,6-trioxane, ethylene/maleic anhydride copolymer, polyaminoacids (either homopolymers or random copolymers), and dextran or poly(n-vinyl pyrrolidone)polyethylene glycol, propropylene glycol homopolymers, prolypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols (*e.g.*, glycerol), polyvinyl alcohol, and mixtures thereof. Polyethylene glycol propionaldehyde may have advantages in manufacturing due to its stability in water. The polymer may be of any molecular weight, and may be branched or unbranched. The number of polymers attached to the antibody may vary, and if more than one polymer are attached, they can be the same or different molecules. In general, the number and/or type of polymers used for derivatization can be determined based on considerations including, but not limited to, the particular properties or functions of the antibody to be improved, whether the antibody derivative will be used in a therapy under defined conditions, etc.

[00208] In another embodiment, conjugates of an antibody and nonproteinaceous moiety that may be selectively heated by exposure to radiation are provided. In one embodiment, the nonproteinaceous moiety is a carbon nanotube (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). The radiation may be of any wavelength, and includes, but is not limited to, wavelengths that do not harm ordinary cells, but which heat the nonproteinaceous moiety to a temperature at which cells proximal to the antibody-nonproteinaceous moiety are killed.

Immunoconjugates

[00209] The invention also provides immunoconjugates (interchangeably referred to as "antibody-drug conjugates," or "ADCs") comprising an antibody conjugated to one or more cytotoxic agents, such as a chemotherapeutic agent, a drug, a growth inhibitory agent, a toxin (*e.g.*, a protein toxin, an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (*i.e.*, a radioconjugate).

[00210] Immunoconjugates have been used for the local delivery of cytotoxic agents, *i.e.*, drugs that kill or inhibit the growth or proliferation of cells, in the treatment of cancer (Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549; Wu *et al.* (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) i

3:207-212; Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26:151-172; U.S. Pat. No. 4,975,278). Immunoconjugates allow for the targeted delivery of a drug moiety to a tumor, and intracellular accumulation therein, where systemic administration of unconjugated drugs may result in unacceptable levels of toxicity to normal cells as well as the tumor cells sought to be eliminated (Baldwin *et al.*, *Lancet* (Mar. 15, 1986) pp. 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (A. Pinchera *et al.*, eds) pp. 475-506. Both polyclonal antibodies and monoclonal antibodies have been reported as useful in these strategies (Rowland *et al.*, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87). Drugs used in these methods include daunomycin, doxorubicin, methotrexate, and vindesine (Rowland *et al.*, (1986) *supra*). Toxins used in antibody-toxin conjugates include bacterial toxins such as diphtheria toxin, plant toxins such as ricin, small molecule toxins such as geldanamycin (Mandler et al (2000) *J. Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maytansinoids (EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), and calicheamicin (Lode et al (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). The toxins may exert their cytotoxic effects by mechanisms including tubulin binding, DNA binding, or topoisomerase inhibition. Some cytotoxic drugs tend to be inactive or less active when conjugated to large antibodies or protein receptor ligands.

[00211] ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) is an antibody-radioisotope conjugate composed of a murine IgG1 kappa monoclonal antibody directed against the CD20 antigen found on the surface of normal and malignant B lymphocytes and 111In or 90Y radioisotope bound by a thiourea linker-chelator (Wiseman et al (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig *et al.* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Although ZEVALIN has activity against B-cell non-Hodgkin's Lymphoma (NHL), administration results in severe and prolonged cytopenias in most patients. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), an antibody-drug conjugate composed of a huCD33 antibody linked to calicheamicin, was approved in 2000 for the treatment of acute

myeloid leukemia by injection (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; U.S. Patent Nos. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansine (Immunogen, Inc.), an antibody-drug conjugate composed of the huC242 antibody linked via the disulfide linker SPP to the maytansinoid drug moiety, DM1, is advancing into Phase II trials for the treatment of cancers that express CanAg, such as colon, pancreatic, gastric, and other cancers. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), an antibody-drug conjugate composed of the anti-prostate specific membrane antigen (PSMA) monoclonal antibody linked to the maytansinoid drug moiety, DM1, is under development for the potential treatment of prostate tumors. The auristatin peptides, auristatin E (AE) and monomethylauristatin (MMAE), synthetic analogs of dolastatin, were conjugated to chimeric monoclonal antibodies cBR96 (specific to Lewis Y on carcinomas) and cAC10 (specific to CD30 on hematological malignancies) (Doronina et al (2003) *Nature Biotechnol.* 21(7):778-784) and are under therapeutic development.

[00212] In certain embodiments, an immunoconjugate comprises an antibody and a chemotherapeutic agent or other toxin. Chemotherapeutic agents useful in the generation of immunoconjugates are described herein (*e.g.*, above). Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from Pseudomonas aeruginosa), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, Phytolaca americana proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. See, *e.g.*, WO 93/21232 published October 28, 1993. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, and ^{186}Re. Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as toluene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-

dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026.

[00213] Conjugates of an antibody and one or more small molecule toxins, such as a calicheamicin, maytansinoids, dolastatins, aurostatins, a trichothecene, and CC1065, and the derivatives of these toxins that have toxin activity, are also contemplated herein.

Maytansine and maytansinoids

[00214] In some embodiments, the immunoconjugate comprises an antibody (full length or fragments) conjugated to one or more maytansinoid molecules.

[00215] Maytansinoids are mitototic inhibitors which act by inhibiting tubulin polymerization. Maytansine was first isolated from the east African shrub Maytenus serrata (U.S. Patent No. 3,896,111). Subsequently, it was discovered that certain microbes also produce maytansinoids, such as maytansinol and C-3 maytansinol esters (U.S. Patent No. 4,151,042). Synthetic maytansinol and derivatives and analogues thereof are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 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; and 4,371,533.

[00216] Maytansinoid drug moieties are attractive drug moieties in antibody drug conjugates because they are: (i) relatively accessible to prepare by fermentation or chemical modification, derivatization of fermentation products, (ii) amenable to derivatization with functional groups suitable for conjugation through the non-disulfide linkers to antibodies, (iii) stable in plasma, and (iv) effective against a variety of tumor cell lines.

[00217] Immunoconjugates containing maytansinoids, methods of making same, and their therapeutic use are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 5,208,020, 5,416,064 and European Patent EP 0 425 235 B1, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) described immunoconjugates comprising a maytansinoid

designated DM1 linked to the monoclonal antibody C242 directed against human colorectal cancer. The conjugate was found to be highly cytotoxic towards cultured colon cancer cells, and showed antitumor activity in an in vivo tumor growth assay. Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992) describe immunoconjugates in which a maytansinoid was conjugated via a disulfide linker to the murine antibody A7 binding to an antigen on human colon cancer cell lines, or to another murine monoclonal antibody TA.1 that binds the HER-2/neu oncogene. The cytotoxicity of the TA.1-maytansinoid conjugate was tested in vitro on the human breast cancer cell line SK-BR-3, which expresses 3 x 105 HER-2 surface antigens per cell. The drug conjugate achieved a degree of cytotoxicity similar to the free maytansinoid drug, which could be increased by increasing the number of maytansinoid molecules per antibody molecule. The A7-maytansinoid conjugate showed low systemic cytotoxicity in mice.

[00218] Antibody-maytansinoid conjugates are prepared by chemically linking an antibody to a maytansinoid molecule without significantly diminishing the biological activity of either the antibody or the maytansinoid molecule. See, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,208,020 (the disclosure of which is hereby expressly incorporated by reference). An average of 3-4 maytansinoid molecules conjugated per antibody molecule has shown efficacy in enhancing cytotoxicity of target cells without negatively affecting the function or solubility of the antibody, although even one molecule of toxin/antibody would be expected to enhance cytotoxicity over the use of naked antibody. Maytansinoids are well known in the art and can be synthesized by known techniques or isolated from natural sources. Suitable maytansinoids are disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,208,020 and in the other patents and nonpatent publications referred to hereinabove. Preferred maytansinoids are maytansinol and maytansinol analogues modified in the aromatic ring or at other positions of the maytansinol molecule, such as various maytansinol esters.

[00219] There are many linking groups known in the art for making antibody-maytansinoid conjugates, including, for example, those disclosed in U.S. Patent No. 5,208,020 or EP Patent 0 425 235 B1, Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992), and U.S. Patent Application No. 10/960,602, filed Oct. 8, 2004, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference. Antibody-maytansinoid conjugates comprising the linker component SMCC may be prepared as

disclosed in U.S. Patent Application No. 10/960,602, filed Oct. 8, 2004. The linking groups include disulfide groups, thioether groups, acid labile groups, photolabile groups, peptidase labile groups, or esterase labile groups, as disclosed in the above-identified patents, disulfide and thioether groups being preferred. Additional linking groups are described and exemplified herein.

[00220] Conjugates of the antibody and maytansinoid may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as toluene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). Particularly preferred coupling agents include N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173:723-737 (1978)) and N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)pentanoate (SPP) to provide for a disulfide linkage.

[00221] The linker may be attached to the maytansinoid molecule at various positions, depending on the type of the link. For example, an ester linkage may be formed by reaction with a hydroxyl group using conventional coupling techniques. The reaction may occur at the C-3 position having a hydroxyl group, the C-14 position modified with hydroxymethyl, the C-15 position modified with a hydroxyl group, and the C-20 position having a hydroxyl group. In a preferred embodiment, the linkage is formed at the C-3 position of maytansinol or a maytansinol analogue.

Auristatins and dolastatins

[00222] In some embodiments, the immunoconjugate comprises an antibody conjugated to dolastatins or dolostatin peptidic analogs and derivatives, the auristatins (U.S. Patent Nos. 5,635,483; 5,780,588). Dolastatins and auristatins have been shown to interfere with microtubule dynamics, GTP hydrolysis, and nuclear and cellular division (Woyke *et al.* (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) and have anticancer (U.S. Patent No. 5,663,149) and antifungal

activity (Pettit *et al.* (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). The dolastatin or auristatin drug moiety may be attached to the antibody through the N (amino) terminus or the C (carboxyl) terminus of the peptidic drug moiety (WO 02/088172).

[00223] Exemplary auristatin embodiments include the N-terminus linked monomethylauristatin drug moieties DE and DF, disclosed in "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," U.S. Ser. No. 10/983,340, filed Nov. 5, 2004, the disclosure of which is expressly incorporated by reference in its entirety.

[00224] Typically, peptide-based drug moieties can be prepared by forming a peptide bond between two or more amino acids and/or peptide fragments. Such peptide bonds can be prepared, for example, according to the liquid phase synthesis method (see E. Schröder and K. Lübke, "The Peptides," volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) that is well known in the field of peptide chemistry. The auristatin/dolastatin drug moieties may be prepared according to the methods of: US 5,635,483; US 5,780,588; Pettit *et al.* (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit *et al.* (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., *et al.* Synthesis, 1996, 719-725; and Pettit *et al.* (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863. See also Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," US Ser. No. 10/983,340, filed Nov. 5, 2004, hereby incorporated by reference in its entirety (disclosing, *e.g.*, linkers and methods of preparing monomethylvaline compounds such as MMAE and MMAF conjugated to linkers).

Calicheamicin

[00225] In other embodiments, the immunoconjugate comprises an antibody conjugated to one or more calicheamicin molecules. The calicheamicin family of antibiotics is capable of producing double-stranded DNA breaks at sub-picomolar concentrations. For the preparation of conjugates of the calicheamicin family, see U.S. Patent Nos. 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (all to American Cyanamid Company). Structural analogues of calicheamicin which may be used include, but are not limited to, γ1I, α2I, α3I, N-acetyl-γ1I, PSAG and θI1 (Hinman *et al.*, Cancer Research 53:3336-3342

(1993), Lode *et al.*, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) and the aforementioned U.S. patents to American Cyanamid). Another anti-tumor drug that the antibody can be conjugated is QFA which is an antifolate. Both calicheamicin and QFA have intracellular sites of action and do not readily cross the plasma membrane. Therefore, cellular uptake of these agents through antibody mediated internalization greatly enhances their cytotoxic effects.

Other cytotoxic agents

[00226] Other antitumor agents that can be conjugated to the antibodies include BCNU, streptozoicin, vincristine and 5-fluorouracil, the family of agents known collectively LL-E33288 complex described in U.S. Patent Nos. 5,053,394, 5,770,710, as well as esperamicins (U.S. Patent No. 5,877,296).

[00227] Enzymatically active toxins and fragments thereof which can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from Pseudomonas aeruginosa), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, Phytolaca americana proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin and the tricothecenes. See, for example, WO 93/21232 published October 28, 1993.

[00228] The present invention further contemplates an immunoconjugate formed between an antibody and a compound with nucleolytic activity (*e.g.*, a ribonuclease or a DNA endonuclease such as a deoxyribonuclease; DNase).

[00229] For selective destruction of the tumor, the antibody may comprise a highly radioactive atom. A variety of radioactive isotopes are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} and radioactive isotopes of Lu. When the conjugate is used for detection, it may comprise a radioactive atom for scintigraphic studies, for example tc99m or I123, or a spin label for nuclear magnetic resonance (NMR) imaging (also known as magnetic resonance imaging, mri), such as iodine-123 again, iodine-131, indium-111, fluorine-19, carbon-13, nitrogen-15, oxygen-17, gadolinium, manganese or iron.

[00230] The radio- or other labels may be incorporated in the conjugate in known ways. For example, the peptide may be biosynthesized or may be synthesized by chemical amino acid synthesis using suitable amino acid precursors involving, for example, fluorine-19 in place of hydrogen. Labels such as $tc^{99}m$ or I^{123}, Re^{186}, Re^{188} and In^{111} can be attached via a cysteine residue in the peptide. Yttrium-90 can be attached via a lysine residue. The IODOGEN method (Fraker *et al.* (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) can be used to incorporate iodine-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describes other methods in detail.

[00231] Conjugates of the antibody and cytotoxic agent may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCl), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as toluene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta *et al.*, Science 238:1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026. The linker may be a "cleavable linker" facilitating release of the cytotoxic drug in the cell. For example, an acid-labile linker, peptidase-sensitive linker, photolabile linker, dimethyl linker or disulfide-containing linker (Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992); U.S. Patent No. 5,208,020) may be used.

[00232] The compounds expressly contemplate, but are not limited to, ADC prepared with cross-linker reagents: 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, and sulfo-SMPB, and SVSB (succinimidyl-(4-vinylsulfone)benzoate) which are commercially available (*e.g.*, from Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). See pages 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparation of antibody drug conjugates

[00233] In the antibody drug conjugates (ADC), an antibody (Ab) is conjugated to one or more drug moieties (D), *e.g.*, about 1 to about 20 drug moieties per antibody, through a linker (L). The ADC of Formula I may be prepared by several routes, employing organic chemistry reactions, conditions, and reagents known to those skilled in the art, including: (1) reaction of a nucleophilic group of an antibody with a bivalent linker reagent, to form Ab-L, via a covalent bond, followed by reaction with a drug moiety D; and (2) reaction of a nucleophilic group of a drug moiety with a bivalent linker reagent, to form D-L, via a covalent bond, followed by reaction with the nucleophilic group of an antibody. Additional methods for preparing ADC are described herein.

$$\mathbf{Ab-(L-D)_p} \qquad \mathbf{I}$$

[00234] The linker may be composed of one or more linker components. Exemplary linker components include 6-maleimidocaproyl ("MC"), maleimidopropanoyl ("MP"), valine-citrulline ("val-cit"), alanine-phenylalanine ("ala-phe"), p-aminobenzyloxycarbonyl ("PAB"), N-Succinimidyl 4-(2-pyridylthio) pentanoate ("SPP"), N-Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1 carboxylate ("SMCC"), and N-Succinimidyl (4-iodo-acetyl) aminobenzoate ("SIAB"). Additional linker components are known in the art and some are described herein. See also "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," US Ser. No. 10/983,340, filed Nov. 5, 2004, the contents of which are hereby incorporated by reference in its entirety.

[00235] In some embodiments, the linker may comprise amino acid residues. Exemplary amino acid linker components include a dipeptide, a tripeptide, a tetrapeptide or a pentapeptide. Exemplary dipeptides include: valine-citrulline (vc or val-cit), alanine-phenylalanine (af or ala-phe). Exemplary tripeptides include: glycine-valine-citrulline (gly-val-cit) and glycine-glycine-glycine (gly-gly-gly). Amino acid residues which comprise an amino acid linker component include those occurring naturally, as well as minor amino acids and non-naturally occurring amino acid analogs, such as citrulline. Amino acid linker components can be designed and optimized in their selectivity for enzymatic cleavage by a particular enzyme, for example, a tumor-associated protease, cathepsin B, C and D, or a plasmin protease.

[00236] Nucleophilic groups on antibodies include, but are not limited to: (i) N-terminal amine groups, (ii) side chain amine groups, *e.g.*, lysine, (iii) side chain thiol groups, *e.g.* cysteine, and (iv) sugar hydroxyl or amino groups where the antibody is glycosylated. Amine, thiol, and hydroxyl groups are nucleophilic and capable of reacting to form covalent bonds with electrophilic groups on linker moieties and linker reagents including: (i) active esters such as NHS esters, HOBt esters, haloformates, and acid halides; (ii) alkyl and benzyl halides such as haloacetamides; (iii) aldehydes, ketones, carboxyl, and maleimide groups. Certain antibodies have reducible interchain disulfides, i.e. cysteine bridges. Antibodies may be made reactive for conjugation with linker reagents by treatment with a reducing agent such as DTT (dithiothreitol). Each cysteine bridge will thus form, theoretically, two reactive thiol nucleophiles. Additional nucleophilic groups can be introduced into antibodies through the reaction of lysines with 2-iminothiolane (Traut's reagent) resulting in conversion of an amine into a thiol. Reactive thiol groups may be introduced into the antibody (or fragment thereof) by introducing one, two, three, four, or more cysteine residues (*e.g.*, preparing mutant antibodies comprising one or more non-native cysteine amino acid residues).

[00237] Antibody drug conjugates may also be produced by modification of the antibody to introduce electrophilic moieties, which can react with nucleophilic substituents on the linker reagent or drug. The sugars of glycosylated antibodies may be oxidized, *e.g.* with periodate oxidizing reagents, to form aldehyde or ketone groups which may react with the amine group of linker reagents or drug moieties. The resulting imine Schiff base groups may form a stable linkage, or may be reduced, *e.g.*, by borohydride reagents to form stable amine linkages. In one embodiment, reaction of the carbohydrate portion of a glycosylated antibody with either glactose oxidase or sodium meta-periodate may yield carbonyl (aldehyde and ketone) groups in the protein that can react with appropriate groups on the drug (Hermanson, Bioconjugate Techniques). In another embodiment, proteins containing N-terminal serine or threonine residues can react with sodium meta-periodate, resulting in production of an aldehyde in place of the first amino acid (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; US 5,362,852). Such aldehydes can be reacted with a drug moiety or linker nucleophile.

[00238] Likewise, nucleophilic groups on a drug moiety include, but are not limited to: amine, thiol, hydroxyl, hydrazide, oxime, hydrazine, thiosemicarbazone, hydrazine carboxylate, and arylhydrazide groups capable of reacting to form covalent bonds with electrophilic groups on linker moieties and linker reagents including: (i) active esters such as NHS esters, HOBt esters, haloformates, and acid halides; (ii) alkyl and benzyl halides such as haloacetamides; (iii) aldehydes, ketones, carboxyl, and maleimide groups.

[00239] Alternatively, a fusion protein comprising the antibody and cytotoxic agent may be made, *e.g.*, by recombinant techniques or peptide synthesis. The length of DNA may comprise respective regions encoding the two portions of the conjugate either adjacent one another or separated by a region encoding a linker peptide which does not destroy the desired properties of the conjugate.

[00240] In yet another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such as streptavidin) for utilization in tumor pre-targeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (*e.g.*, avidin) which is conjugated to a cytotoxic agent (*e.g.*, a radionucleotide).

Certain Methods of Making Antibodies

Certain Hybridoma-Based Methods

[00241] Monoclonal antibodies of the invention can be made using the hybridoma method first described by Kohler *et al., Nature,* 256:495 (1975), and further described, *e.g.*, in Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), and Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) regarding human-human hybridomas. Additional methods include those described, for example, in U.S. Pat. No. 7,189,826 regarding production of monoclonal human natural IgM antibodies from hybridoma cell lines. Human hybridoma technology (Trioma technology) is described in Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) and Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

[00242] For various other hybridoma techniques, see, *e.g.*, US 2006/258841; US 2006/183887 (fully human antibodies), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; and U.S. Patent Nos. 7,078,492 and 7,153,507. An exemplary protocol for producing monoclonal antibodies using the hybridoma method is described as follows. In one embodiment, a mouse or other appropriate host animal, such as a hamster, is immunized to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the protein used for immunization. Antibodies are raised in animals by multiple subcutaneous (sc) or intraperitoneal (ip) injections of a polypeptide comprising VEGF or a fragment thereof, and an adjuvant, such as monophosphoryl lipid A (MPL)/trehalose dicrynomycolate (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT). A polypeptide comprising VEGF or a fragment thereof may be prepared using methods well known in the art, such as recombinant methods, some of which are further described herein. Serum from immunized animals is assayed for anti-VEGF antibodies, and booster immunizations are optionally administered. Lymphocytes from animals producing anti-VEGF antibodies are isolated. Alternatively, lymphocytes may be immunized *in vitro*.

[00243] Lymphocytes are then fused with myeloma cells using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell. See, *e.g.*, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986). Myeloma cells may be used that fuse efficiently, support stable high-level production of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. Exemplary myeloma cells include, but are not limited to, murine myeloma lines, such as those derived from MOPC-21 and MPC-11 mouse tumors available from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, and SP-2 or X63-Ag8-653 cells available from the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[00244] The hybridoma cells thus prepared are seeded and grown in a suitable culture medium, *e.g.*, a medium that contains one or more substances that

inhibit the growth or survival of the unfused, parental myeloma cells. For example, if the parental myeloma cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (HAT medium), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells. Preferably, serum-free hybridoma cell culture methods are used to reduce use of animal-derived serum such as fetal bovine serum, as described, for example, in Even *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108 (2006).

[00245] Oligopeptides as tools for improving productivity of hybridoma cell cultures are described in Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005). Specifically, standard culture media are enriched with certain amino acids (alanine, serine, asparagine, proline), or with protein hydrolyzate fractions, and apoptosis may be significantly suppressed by synthetic oligopeptides, constituted of three to six amino acid residues. The peptides are present at millimolar or higher concentrations.

[00246] Culture medium in which hybridoma cells are growing may be assayed for production of monoclonal antibodies that bind to VEGF. The binding specificity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells may be determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA). The binding affinity of the monoclonal antibody can be determined, for example, by Scatchard analysis. See, *e.g.*, Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

[00247] After hybridoma cells are identified that produce antibodies of the desired specificity, affinity, and/or activity, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods. See, *e.g.*, Goding, *supra*. Suitable culture media for this purpose include, for example, D-MEM or RPMI-1640 medium. In addition, hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites tumors in an animal. Monoclonal antibodies secreted by the subclones are suitably separated from the culture medium, ascites fluid, or serum by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography. One procedure for isolation of proteins from hybridoma cells is described in US 2005/176122 and U.S. Patent No. 6,919,436. The method includes using minimal

salts, such as lyotropic salts, in the binding process and preferably also using small amounts of organic solvents in the elution process.

Certain Library Screening Methods

[00248] Antibodies of the invention can be made by using combinatorial libraries to screen for antibodies with the desired activity or activities. For example, a variety of methods are known in the art for generating phage display libraries and screening such libraries for antibodies possessing the desired binding characteristics. Such methods are described generally in Hoogenboom *et al.* in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). For example, one method of generating antibodies of interest is through the use of a phage antibody library as described in Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93.

[00249] In principle, synthetic antibody clones are selected by screening phage libraries containing phage that display various fragments of antibody variable region (Fv) fused to phage coat protein. Such phage libraries are panned by affinity chromatography against the desired antigen. Clones expressing Fv fragments capable of binding to the desired antigen are adsorbed to the antigen and thus separated from the non-binding clones in the library. The binding clones are then eluted from the antigen, and can be further enriched by additional cycles of antigen adsorption/elution. Any of the antibodies of the invention can be obtained by designing a suitable antigen screening procedure to select for the phage clone of interest followed by construction of a full length antibody clone using the Fv sequences from the phage clone of interest and suitable constant region (Fc) sequences described in Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

[00250] In certain embodiments, the antigen-binding domain of an antibody is formed from two variable (V) regions of about 110 amino acids, one each from the light (VL) and heavy (VH) chains, that both present three hypervariable loops (HVRs) or complementarity-determining regions (CDRs). Variable domains can be displayed functionally on phage, either as single-chain Fv (scFv) fragments, in which VH and VL are covalently linked through a short, flexible peptide, or as Fab fragments, in which they are each fused to a constant domain and interact non-covalently, as described in Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). As used herein,

scFv encoding phage clones and Fab encoding phage clones are collectively referred to as "Fv phage clones" or "Fv clones."

[00251] Repertoires of VH and VL genes can be separately cloned by polymerase chain reaction (PCR) and recombined randomly in phage libraries, which can then be searched for antigen-binding clones as described in Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Libraries from immunized sources provide high-affinity antibodies to the immunogen without the requirement of constructing hybridomas. Alternatively, the naive repertoire can be cloned to provide a single source of human antibodies to a wide range of non-self and also self antigens without any immunization as described by Griffiths *et al.*, *EMBO J,* 12: 725-734 (1993). Finally, naive libraries can also be made synthetically by cloning the unrearranged V-gene segments from stem cells, and using PCR primers containing random sequence to encode the highly variable CDR3 regions and to accomplish rearrangement in vitro as described by Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

[00252] In certain embodiments, filamentous phage is used to display antibody fragments by fusion to the minor coat protein pIII. The antibody fragments can be displayed as single chain Fv fragments, in which VH and VL domains are connected on the same polypeptide chain by a flexible polypeptide spacer, *e.g.*, as described by Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), or as Fab fragments, in which one chain is fused to pIII and the other is secreted into the bacterial host cell periplasm where assembly of a Fab-coat protein structure which becomes displayed on the phage surface by displacing some of the wild type coat proteins, *e.g.*, as described in Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

[00253] In general, nucleic acids encoding antibody gene fragments are obtained from immune cells harvested from humans or animals. If a library biased in favor of anti-VEGF clones is desired, the subject is immunized with VEGF to generate an antibody response, and spleen cells and/or circulating B cells other peripheral blood lymphocytes (PBLs) are recovered for library construction. In a preferred embodiment, a human antibody gene fragment library biased in favor of anti-VEGF clones is obtained by generating an anti-VEGF antibody response in transgenic mice carrying a functional human immunoglobulin gene array (and lacking a functional endogenous antibody production system) such that VEGF immunization

gives rise to B cells producing human antibodies against VEGF. The generation of human antibody-producing transgenic mice is described below.

[00254] Additional enrichment for anti-VEGF reactive cell populations can be obtained by using a suitable screening procedure to isolate B cells expressing VEGF-specific membrane bound antibody, *e.g.*, by cell separation using VEGF affinity chromatography or adsorption of cells to fluorochrome-labeled VEGF followed by flow-activated cell sorting (FACS).

[00255] Alternatively, the use of spleen cells and/or B cells or other PBLs from an unimmunized donor provides a better representation of the possible antibody repertoire, and also permits the construction of an antibody library using any animal (human or non-human) species in which VEGF is not antigenic. For libraries incorporating in vitro antibody gene construction, stem cells are harvested from the subject to provide nucleic acids encoding unrearranged antibody gene segments. The immune cells of interest can be obtained from a variety of animal species, such as human, mouse, rat, lagomorpha, luprine, canine, feline, porcine, bovine, equine, and avian species, etc.

[00256] Nucleic acid encoding antibody variable gene segments (including VH and VL segments) are recovered from the cells of interest and amplified. In the case of rearranged VH and VL gene libraries, the desired DNA can be obtained by isolating genomic DNA or mRNA from lymphocytes followed by polymerase chain reaction (PCR) with primers matching the 5' and 3' ends of rearranged VH and VL genes as described in Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)*, 86: 3833-3837 (1989), thereby making diverse V gene repertoires for expression. The V genes can be amplified from cDNA and genomic DNA, with back primers at the 5' end of the exon encoding the mature V-domain and forward primers based within the J-segment as described in Orlandi *et al.* (1989) and in Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). However, for amplifying from cDNA, back primers can also be based in the leader exon as described in Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), and forward primers within the constant region as described in Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)*, 86: 5728-5732 (1989). To maximize complementarity, degeneracy can be incorporated in the primers as described in Orlandi *et al.* (1989) or Sastry *et al.* (1989). In certain embodiments, library diversity is maximized by using PCR primers targeted to each V-gene family in order to amplify all available VH and VL

arrangements present in the immune cell nucleic acid sample, *e.g.* as described in the method of Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) or as described in the method of Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). For cloning of the amplified DNA into expression vectors, rare restriction sites can be introduced within the PCR primer as a tag at one end as described in Orlandi *et al.* (1989), or by further PCR amplification with a tagged primer as described in Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

[00257] Repertoires of synthetically rearranged V genes can be derived in vitro from V gene segments. Most of the human VH-gene segments have been cloned and sequenced (reported in Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), and mapped (reported in Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993); these cloned segments (including all the major conformations of the H1 and H2 loop) can be used to generate diverse VH gene repertoires with PCR primers encoding H3 loops of diverse sequence and length as described in Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). VH repertoires can also be made with all the sequence diversity focused in a long H3 loop of a single length as described in Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 89: 4457-4461 (1992). Human Vκ and Vλ segments have been cloned and sequenced (reported in Williams and Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) and can be used to make synthetic light chain repertoires. Synthetic V gene repertoires, based on a range of VH and VL folds, and L3 and H3 lengths, will encode antibodies of considerable structural diversity. Following amplification of V-gene encoding DNAs, germline V-gene segments can be rearranged in vitro according to the methods of Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

[00258] Repertoires of antibody fragments can be constructed by combining VH and VL gene repertoires together in several ways. Each repertoire can be created in different vectors, and the vectors recombined *in vitro*, *e.g.*, as described in Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128: 119-126 (1993), or *in vivo* by combinatorial infection, *e.g.*, the loxP system described in Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). The *in vivo* recombination approach exploits the two-chain nature of Fab fragments to overcome the limit on library size imposed by *E. coli* transformation efficiency. Naive VH and VL repertoires are cloned separately, one into a phagemid and the other into a phage vector. The two libraries are then combined by phage infection of phagemid-containing bacteria so that each cell contains a different

combination and the library size is limited only by the number of cells present (about 10^{12} clones). Both vectors contain in vivo recombination signals so that the VH and VL genes are recombined onto a single replicon and are co-packaged into phage virions. These huge libraries provide large numbers of diverse antibodies of good affinity (K_d^{-1} of about 10^{-8} M).

[00259] Alternatively, the repertoires may be cloned sequentially into the same vector, *e.g.*, as described in Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A,* 88: 7978-7982 (1991), or assembled together by PCR and then cloned, *e.g.* as described in Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). PCR assembly can also be used to join VH and VL DNAs with DNA encoding a flexible peptide spacer to form single chain Fv (scFv) repertoires. In yet another technique, "in cell PCR assembly" is used to combine VH and VL genes within lymphocytes by PCR and then clone repertoires of linked genes as described in Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

[00260] The antibodies produced by naive libraries (either natural or synthetic) can be of moderate affinity (K_d^{-1} of about 10^6 to 10^7 M^{-1}), but affinity maturation can also be mimicked *in vitro* by constructing and reselecting from secondary libraries as described in Winter *et al.* (1994), *supra.* For example, mutation can be introduced at random *in vitro* by using error-prone polymerase (reported in Leung *et al.*, *Technique,* 1: 11-15 (1989)) in the method of Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.,* 226: 889-896 (1992) or in the method of Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A*, 89: 3576-3580 (1992). Additionally, affinity maturation can be performed by randomly mutating one or more CDRs, *e.g.*, using PCR with primers carrying random sequence spanning the CDR of interest, in selected individual Fv clones and screening for higher affinity clones. WO 9607754 (published 14 March 1996) described a method for inducing mutagenesis in a complementarity determining region of an immunoglobulin light chain to create a library of light chain genes. Another effective approach is to recombine the VH or VL domains selected by phage display with repertoires of naturally occurring V domain variants obtained from unimmunized donors and screen for higher affinity in several rounds of chain reshuffling as described in Marks *et al.*, *Biotechnol.,* 10: 779-783 (1992). This technique allows the production of antibodies and antibody fragments with affinities of about 10^{-9} M or less.

[00261] Screening of the libraries can be accomplished by various techniques known in the art. For example, VEGF can be used to coat the wells of adsorption plates, expressed on host cells affixed to adsorption plates or used in cell sorting, or conjugated to biotin for capture with streptavidin-coated beads, or used in any other method for panning phage display libraries.

[00262] The phage library samples are contacted with immobilized VEGF under conditions suitable for binding at least a portion of the phage particles with the adsorbent. Normally, the conditions, including pH, ionic strength, temperature and the like are selected to mimic physiological conditions. The phages bound to the solid phase are washed and then eluted by acid, *e.g.*, as described in Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A*, 88: 7978-7982 (1991), or by alkali, *e.g.*, as described in Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), or by VEGF antigen competition, *e.g.*, in a procedure similar to the antigen competition method of Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Phages can be enriched 20-1,000-fold in a single round of selection. Moreover, the enriched phages can be grown in bacterial culture and subjected to further rounds of selection.

[00263] The efficiency of selection depends on many factors, including the kinetics of dissociation during washing, and whether multiple antibody fragments on a single phage can simultaneously engage with antigen. Antibodies with fast dissociation kinetics (and weak binding affinities) can be retained by use of short washes, multivalent phage display and high coating density of antigen in solid phase. The high density not only stabilizes the phage through multivalent interactions, but favors rebinding of phage that has dissociated. The selection of antibodies with slow dissociation kinetics (and good binding affinities) can be promoted by use of long washes and monovalent phage display as described in Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) and in WO 92/09690, and a low coating density of antigen as described in Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

[00264] It is possible to select between phage antibodies of different affinities, even with affinities that differ slightly, for VEGF. However, random mutation of a selected antibody (*e.g.*, as performed in some affinity maturation techniques) is likely to give rise to many mutants, most binding to antigen, and a few with higher affinity. With limiting VEGF, rare high affinity phage could be competed out. To retain all higher affinity mutants, phages can be incubated with excess

biotinylated VEGF, but with the biotinylated VEGF at a concentration of lower molarity than the target molar affinity constant for VEGF. The high affinity-binding phages can then be captured by streptavidin-coated paramagnetic beads. Such "equilibrium capture" allows the antibodies to be selected according to their affinities of binding, with sensitivity that permits isolation of mutant clones with as little as two-fold higher affinity from a great excess of phages with lower affinity. Conditions used in washing phages bound to a solid phase can also be manipulated to discriminate on the basis of dissociation kinetics.

[00265] Anti-VEGF clones may be selected based on activity. In certain embodiments, the invention provides anti-VEGF antibodies that bind to living cells that naturally express VEGF. In one embodiment, the invention provides anti-VEGF antibodies that block the binding between a VEGF ligand and VEGF, but do not block the binding between a VEGF ligand and a second protein. Fv clones corresponding to such anti-VEGF antibodies can be selected by (1) isolating anti-VEGF clones from a phage library as described above, and optionally amplifying the isolated population of phage clones by growing up the population in a suitable bacterial host; (2) selecting VEGF and a second protein against which blocking and non-blocking activity, respectively, is desired; (3) adsorbing the anti-VEGF phage clones to immobilized VEGF; (4) using an excess of the second protein to elute any undesired clones that recognize VEGF-binding determinants which overlap or are shared with the binding determinants of the second protein; and (5) eluting the clones which remain adsorbed following step (4). Optionally, clones with the desired blocking/non-blocking properties can be further enriched by repeating the selection procedures described herein one or more times.

[00266] DNA encoding hybridoma-derived monoclonal antibodies or phage display Fv clones of the invention is readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide primers designed to specifically amplify the heavy and light chain coding regions of interest from hybridoma or phage DNA template). Once isolated, the DNA can be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of the desired monoclonal antibodies in the recombinant host cells. Review articles on recombinant

expression in bacteria of antibody-encoding DNA include Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) and Pluckthun, *Immunol. Revs*, 130: 151 (1992).

[00267] DNA encoding the Fv clones of the invention can be combined with known DNA sequences encoding heavy chain and/or light chain constant regions (*e.g.* the appropriate DNA sequences can be obtained from Kabat *et al.*, supra) to form clones encoding full or partial length heavy and/or light chains. It will be appreciated that constant regions of any isotype can be used for this purpose, including IgG, IgM, IgA, IgD, and IgE constant regions, and that such constant regions can be obtained from any human or animal species. An Fv clone derived from the variable domain DNA of one animal (such as human) species and then fused to constant region DNA of another animal species to form coding sequence(s) for "hybrid," full length heavy chain and/or light chain is included in the definition of "chimeric" and "hybrid" antibody as used herein. In certain embodiments, an Fv clone derived from human variable DNA is fused to human constant region DNA to form coding sequence(s) for full- or partial-length human heavy and/or light chains.

[00268] DNA encoding anti-VEGF antibody derived from a hybridoma of the invention can also be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy- and light-chain constant domains in place of homologous murine sequences derived from the hybridoma clone (*e.g.*, as in the method of Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 81: 6851-6855 (1984)). DNA encoding a hybridoma- or Fv clone-derived antibody or fragment can be further modified by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. In this manner, "chimeric" or "hybrid" antibodies are prepared that have the binding specificity of the Fv clone or hybridoma clone-derived antibodies of the invention.

Vectors, Host Cells, and Recombinant Methods

[00269] Antibodies may also be produced using recombinant methods. For recombinant production of an anti-VEGF antibody, nucleic acid encoding the antibody is isolated and inserted into a replicable vector for further cloning (amplification of the DNA) or for expression. DNA encoding the antibody may be readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the

heavy and light chains of the antibody). Many vectors are available. The vector components generally include, but are not limited to, one or more of the following: a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence.

Signal sequence component

[00270] An antibody of the invention may be produced recombinantly not only directly, but also as a fusion polypeptide with a heterologous polypeptide, which is preferably a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide. The heterologous signal sequence selected preferably is one that is recognized and processed (*i.e.*, cleaved by a signal peptidase) by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process a native antibody signal sequence, the signal sequence is substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion the native signal sequence may be substituted by, *e.g.*, the yeast invertase leader, α factor leader (including *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* α-factor leaders), or acid phosphatase leader, the *C. albicans* glucoamylase leader, or the signal described in WO 90/13646. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences as well as viral secretory leaders, for example, the herpes simplex gD signal, are available.

Origin of replication

[00271] Both expression and cloning vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Generally, in cloning vectors this sequence is one that enables the vector to replicate independently of the host chromosomal DNA, and includes origins of replication or autonomously replicating sequences. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2μ plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins (SV40, polyoma, adenovirus, VSV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells. Generally, the origin of replication component is

not needed for mammalian expression vectors (the SV40 origin may typically be used only because it contains the early promoter).

Selection gene component

[00272] Expression and cloning vectors may contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, *e.g.,* ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, *e.g.,* the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli.*

[00273] One example of a selection scheme utilizes a drug to arrest growth of a host cell. Those cells that are successfully transformed with a heterologous gene produce a protein conferring drug resistance and thus survive the selection regimen. Examples of such dominant selection use the drugs neomycin, mycophenolic acid and hygromycin.

[00274] Another example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up antibody-encoding nucleic acid, such as DHFR, glutamine synthetase (GS), thymidine kinase, metallothionein-I and -II, preferably primate metallothionein genes, adenosine deaminase, ornithine decarboxylase, etc.

[00275] For example, cells transformed with the DHFR gene are identified by culturing the transformants in a culture medium containing methotrexate (Mtx), a competitive antagonist of DHFR. Under these conditions, the DHFR gene is amplified along with any other co-transformed nucleic acid. A Chinese hamster ovary (CHO) cell line deficient in endogenous DHFR activity (*e.g.*, ATCC CRL-9096) may be used.

[00276] Alternatively, cells transformed with the GS gene are identified by culturing the transformants in a culture medium containing L-methionine sulfoximine (Msx), an inhibitor of GS. Under these conditions, the GS gene is amplified along with any other co-transformed nucleic acid. The GS selection/amplification system may be used in combination with the DHFR selection/amplification system described above.

[00277] Alternatively, host cells (particularly wild-type hosts that contain endogenous DHFR) transformed or co-transformed with DNA sequences encoding an antibody of interest, wild-type DHFR gene, and another selectable marker such as aminoglycoside 3'-phosphotransferase (APH) can be selected by cell growth in medium containing a selection agent for the selectable marker such as an aminoglycosidic antibiotic, *e.g.,* kanamycin, neomycin, or G418. See U.S. Patent No. 4,965,199.

[00278] A suitable selection gene for use in yeast is the *trp*1 gene present in the yeast plasmid YRp7 (Stinchcomb *et al., Nature*, 282:39 (1979)). The *trp*1 gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example, ATCC No. 44076 or PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). The presence of the *trp*1 lesion in the yeast host cell genome then provides an effective environment for detecting transformation by growth in the absence of tryptophan. Similarly, *Leu*2-deficient yeast strains (ATCC 20,622 or 38,626) are complemented by known plasmids bearing the *Leu*2 gene.

[00279] In addition, vectors derived from the 1.6 μm circular plasmid pKD1 can be used for transformation of *Kluyveromyces* yeasts. Alternatively, an expression system for large-scale production of recombinant calf chymosin was reported for *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). Stable multi-copy expression vectors for secretion of mature recombinant human serum albumin by industrial strains of *Kluyveromyces* have also been disclosed. Fleer *et al., Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

Promoter component

[00280] Expression and cloning vectors generally contain a promoter that is recognized by the host organism and is operably linked to nucleic acid encoding an antibody. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the *phoA* promoter , β-lactamase and lactose promoter systems, alkaline phosphatase promoter, a tryptophan (trp) promoter system, and hybrid promoters such as the tac promoter. However, other known bacterial promoters are suitable. Promoters for use in bacterial systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding an antibody.

[00281] Promoter sequences are known for eukaryotes. Virtually all eukaryotic genes have an AT-rich region located approximately 25 to 30 bases upstream from the site where transcription is initiated. Another sequence found 70 to 80 bases upstream from the start of transcription of many genes is a CNCAAT region where N may be any nucleotide. At the 3' end of most eukaryotic genes is an AATAAA sequence that may be the signal for addition of the polyA tail to the 3' end of the coding sequence. All of these sequences are suitably inserted into eukaryotic expression vectors.

[00282] Examples of suitable promoter sequences for use with yeast hosts include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes, such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase.

[00283] Other yeast promoters, which are inducible promoters having the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in EP 73,657. Yeast enhancers also are advantageously used with yeast promoters.

[00284] Antibody transcription from vectors in mammalian host cells can be controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus, Simian Virus 40 (SV40), or from heterologous mammalian promoters, *e.g.,* the actin promoter or an immunoglobulin promoter, from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

[00285] The early and late promoters of the SV40 virus are conveniently obtained as an SV40 restriction fragment that also contains the SV40 viral origin of replication. The immediate early promoter of the human cytomegalovirus is conveniently obtained as a HindIII E restriction fragment. A system for expressing

DNA in mammalian hosts using the bovine papilloma virus as a vector is disclosed in U.S. Patent No. 4,419,446. A modification of this system is described in U.S. Patent No. 4,601,978. See also Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) on expression of human β-interferon cDNA in mouse cells under the control of a thymidine kinase promoter from herpes simplex virus. Alternatively, the Rous Sarcoma Virus long terminal repeat can be used as the promoter.

Enhancer element component

[00286] Transcription of a DNA encoding an antibody of this invention by higher eukaryotes is often increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin, α-fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. See also Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) on enhancing elements for activation of eukaryotic promoters. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the antibody-encoding sequence, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

Transcription termination component

[00287] Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding antibody. One useful transcription termination component is the bovine growth hormone polyadenylation region. See WO94/11026 and the expression vector disclosed therein.

Selection and transformation of host cells

[00288] Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein are the prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells described above. Suitable prokaryotes for this purpose include eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, Enterobacteriaceae such as *Escherichia*, *e.g.*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *e.g.*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, *e.g.*, *Serratia marcescans*, and *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* (*e.g.*, *B. licheniformis* 41P disclosed in DD 266,710 published 12 April 1989), *Pseudomonas* such as *P. aeruginosa*, and *Streptomyces*. One preferred *E. coli* cloning host is *E. coli* 294 (ATCC 31,446), although other strains such as *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), and *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) are suitable. These examples are illustrative rather than limiting.

[00289] Full length antibody, antibody fusion proteins, and antibody fragments can be produced in bacteria, in particular when glycosylation and Fc effector function are not needed, such as when the therapeutic antibody is conjugated to a cytotoxic agent (*e.g.*, a toxin) that by itself shows effectiveness in tumor cell destruction. Full length antibodies have greater half life in circulation. Production in E. coli is faster and more cost efficient. For expression of antibody fragments and polypeptides in bacteria, see, *e.g.*, U.S. 5,648,237 (Carter et. al.), U.S. 5,789,199 (Joly *et al.*), U.S. 5,840,523 (Simmons *et al.*), which describes translation initiation region (TIR) and signal sequences for optimizing expression and secretion. See also Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, describing expression of antibody fragments in *E. coli*. After expression, the antibody may be isolated from the *E. coli* cell paste in a soluble fraction and can be purified through, *e.g.*, a protein A or G column depending on the isotype. Final purification can be carried out similar to the process for purifying antibody expressed e.g, in CHO cells.

[00290] In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for antibody-encoding vectors. *Saccharomyces cerevisiae*, or common baker's yeast, is the most commonly used among lower eukaryotic host microorganisms. However, a number of other genera, species, and strains are commonly available and useful herein, such as *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces* hosts such as, *e.g.*, *K. lactis*, *K.*

fragilis (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickeramii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilarum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, and *K. marxianus; yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida; Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* such as *Schwanniomyces occidentalis*; and filamentous fungi such as, *e.g., Neurospora, Penicillium, Tolypocladium*, and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* and *A. niger*. For a review discussing the use of yeasts and filamentous fungi for the production of therapeutic proteins, see, *e.g.*, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).

[00291] Certain fungi and yeast strains may be selected in which glycosylation pathways have been "humanized, " resulting in the production of an antibody with a partially or fully human glycosylation pattern. See, *e.g.*, Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (describing humanization of the glycosylation pathway in *Pichia pastoris*); and Gerngross *et al.*, *supra*.

[00292] Suitable host cells for the expression of glycosylated antibody are also derived from multicellular organisms (invertebrates and vertebrates). Examples of invertebrate cells include plant and insect cells. Numerous baculoviral strains and variants and corresponding permissive insect host cells from hosts such as *Spodoptera frugiperda* (caterpillar), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (fruitfly), and *Bombyx mori* have been identified. A variety of viral strains for transfection are publicly available, *e.g.*, the L-1 variant of *Autographa californica* NPV and the Bm-5 strain of *Bombyx mori* NPV, and such viruses may be used as the virus herein according to the present invention, particularly for transfection of *Spodoptera frugiperda* cells.

[00293] Plant cell cultures of cotton, corn, potato, soybean, petunia, tomato, duckweed (*Lemnaceae*), alfalfa (*M. truncatula*), and tobacco can also be utilized as hosts. *See, e.g.*, US Patent Nos. 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, and 6,417,429 (describing PLANTIBODIES™ technology for producing antibodies in transgenic plants).

[00294] Vertebrate cells may be used as hosts, and propagation of vertebrate cells in culture (tissue culture) has become a routine procedure. Examples of useful mammalian host cell lines are monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells

subcloned for growth in suspension culture, Graham *et al., J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); baby hamster kidney cells (BHK, ATCC CCL 10); mouse sertoli cells (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); monkey kidney cells (CV1 ATCC CCL 70); African green monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1587); human cervical carcinoma cells (HELA, ATCC CCL 2); canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34); buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI cells (Mather *et al., Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5 cells; FS4 cells; and a human hepatoma line (Hep G2). Other useful mammalian host cell lines include Chinese hamster ovary (CHO) cells, including DHFR$^-$ CHO cells (Urlaub *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); and myeloma cell lines such as NS0 and Sp2/0. For a review of certain mammalian host cell lines suitable for antibody production, see, *e.g.*, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 255-268.

[00295] Host cells are transformed with the above-described expression or cloning vectors for antibody production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences.

Culturing the host cells

[00296] The host cells used to produce an antibody of this invention may be cultured in a variety of media. Commercially available media such as Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) are suitable for culturing the host cells. In addition, any of the media described in Ham *et al., Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al., Anal. Biochem.*102:255 (1980), U.S. Pat. Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; or 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; or U.S. Patent Re. 30,985 may be used as culture media for the host cells. Any of these media may be supplemented as necessary with hormones and/or other growth factors (such as insulin, transferrin, or epidermal growth factor), salts (such as sodium chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers (such as HEPES), nucleotides (such as adenosine and thymidine), antibiotics (such as GENTAMYCIN™ drug), trace

elements (defined as inorganic compounds usually present at final concentrations in the micromolar range), and glucose or an equivalent energy source. Any other necessary supplements may also be included at appropriate concentrations that would be known to those skilled in the art. The culture conditions, such as temperature, pH, and the like, are those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan.

Purification of antibody

[00297] When using recombinant techniques, the antibody can be produced intracellularly, in the periplasmic space, or directly secreted into the medium. If the antibody is produced intracellularly, as a first step, the particulate debris, either host cells or lysed fragments, are removed, for example, by centrifugation or ultrafiltration. Carter *et al., Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describe a procedure for isolating antibodies which are secreted to the periplasmic space of *E. coli.* Briefly, cell paste is thawed in the presence of sodium acetate (pH 3.5), EDTA, and phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) over about 30 min. Cell debris can be removed by centrifugation. Where the antibody is secreted into the medium, supernatants from such expression systems are generally first concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an Amicon or Millipore Pellicon ultrafiltration unit. A protease inhibitor such as PMSF may be included in any of the foregoing steps to inhibit proteolysis and antibiotics may be included to prevent the growth of adventitious contaminants.

[00298] The antibody composition prepared from the cells can be purified using, for example, hydroxylapatite chromatography, hydrophobic interaction chromatography, gel electrophoresis, dialysis, and affinity chromatography, with affinity chromatography being among one of the typically preferred purification steps. The suitability of protein A as an affinity ligand depends on the species and isotype of any immunoglobulin Fc domain that is present in the antibody. Protein A can be used to purify antibodies that are based on human γ1, γ2, or γ4 heavy chains (Lindmark *et al., J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Protein G is recommended for all mouse isotypes and for human γ3 (Guss *et al., EMBO J.* 5:15671575 (1986)). The matrix to which the affinity ligand is attached is most often agarose, but other matrices are available. Mechanically stable matrices such as controlled pore glass or

poly(styrenedivinyl)benzene allow for faster flow rates and shorter processing times than can be achieved with agarose. Where the antibody comprises a C_H3 domain, the Bakerbond ABX™resin (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) is useful for purification. Other techniques for protein purification such as fractionation on an ion-exchange column, ethanol precipitation, Reverse Phase HPLC, chromatography on silica, chromatography on heparin SEPHAROSE™ chromatography on an anion or cation exchange resin (such as a polyaspartic acid column), chromatofocusing, SDS-PAGE, and ammonium sulfate precipitation are also available depending on the antibody to be recovered.

[00299] Following any preliminary purification step(s), the mixture comprising the antibody of interest and contaminants may be subjected to low pH hydrophobic interaction chromatography using an elution buffer at a pH between about 2.5-4.5, preferably performed at low salt concentrations (*e.g.*, from about 0-0.25M salt).

[00300] In general, various methodologies for preparing antibodies for use in research, testing, and clinical are well-established in the art, consistent with the above-described methodologies and/or as deemed appropriate by one skilled in the art for a particular antibody of interest.

Pharmaceutical formulations and dosages

[00301] The antibody composition will be formulated, dosed, and administered in a fashion consistent with good medical practice. Factors for consideration in this context include the particular disorder being treated, the particular mammal being treated, the clinical condition of the individual patient, the cause of the disorder, the site of delivery of the agent, the method of administration, the scheduling of administration, and other factors known to medical practitioners. The "therapeutically effective amount" of the antibody to be administered will be governed by such considerations, and is the minimum amount necessary to prevent, ameliorate, or treat a disease or disorder. The antibody need not be, but is optionally formulated with one or more agents currently used to prevent or treat the disorder in question. The effective amount of such other agents depends on the amount of antibody present in the formulation, the type of disorder or treatment, and other factors discussed above. These are generally used in the same dosages and with

administration routes as used hereinbefore or about from 1 to 99% of the heretofore employed dosages. Generally, alleviation or treatment of a disease or disorder involves the lessening of one or more symptoms or medical problems associated with the disease or disorder. In the case of cancer, the therapeutically effective amount of the drug can accomplish one or a combination of the following: reduce the number of cancer cells; reduce the tumor size; inhibit (*i.e.*, to decrease to some extent and/or stop) cancer cell infiltration into peripheral organs; inhibit tumor metastasis; inhibit, to some extent, tumor growth; and/or relieve to some extent one or more of the symptoms associated with the cancer. To the extent the drug may prevent growth and/or kill existing cancer cells, it may be cytostatic and/or cytotoxic. In some embodiments, a composition of this invention can be used to prevent the onset or reoccurrence of the disease or disorder in a subject or mammal.

[00302] For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of an antibody of the invention (when used alone or in combination with one or more other additional therapeutic agents) will depend on the type of disease to be treated, the type of antibody, the severity and course of the disease, whether the antibody is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, and the discretion of the attending physician. The antibody is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments.

[00303] In certain embodiments, depending on the type and severity of the disease, about 1 μg/kg to 50 mg/kg (*e.g.*, 0.1-20 mg/kg) of antibody is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. In another embodiment, about 1 μg/kg to 15 mg/kg (*e.g.* 0.1 mg/kg-10 mg/kg) of antibody is an initial candidate dosage for administration to the patient. A typical daily dosage might range from about 1 μg/kg to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs.

[00304] One exemplary dosage of the antibody would be in the range from about 0.05 mg/kg to about 15 mg/kg. Thus, one or more doses of about 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg, 7.5 mg/kg, 10 mg/kg or 15 mg/kg (or any combination thereof) may be administered to the patient. Such doses may be administered intermittently,

e.g. every day, every three days, every week or every two to three weeks (*e.g.*, such that the patient receives from about two to about twenty, or *e.g.* about six doses of the antibody). In one embodiment, dose of about 10 mg/kg is administered every three days. An initial higher loading dose, followed by one or more lower doses may be administered. In one embodiment, an exemplary dosing regimen comprises administering an initial loading dose of about 4 mg/kg, followed by a weekly maintenance dose of about 2 mg/kg of the antibody. However, other dosage regimens may be useful.

[00305] In certain embodiments, dosing regimens discussed herein are used in combination with a chemotherapy regimen as the first line therapy for treating metastatic colorectal cancer. In some aspects, the chemotherapy regimen involves the traditional high-dose intermittent administration. In some other aspects, the chemotherapeutic agents are administered using smaller and more frequent doses without scheduled breaks ("metronomic chemotherapy").

[00306] The progress of the therapy of the invention is easily monitored by conventional techniques and assays.

[00307] An antibody of the invention (and any additional therapeutic agent or adjuvant) can be administered by any suitable means, including parenteral, subcutaneous, intraperitoneal, intrapulmonary, and intranasal, and, if desired for local treatment, intralesional administration. Parenteral infusions include intramuscular, intravenous, intraarterial, intraperitoneal, or subcutaneous administration. In addition, the antibody is suitably administered by pulse infusion, particularly with declining doses of the antibody. Dosing can be by any suitable route, *e.g.*, by injections, such as intravenous or subcutaneous injections, depending in part on whether the administration is brief or chronic.

[00308] Pharmaceutical formulations herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

[00309] Pharmaceutical formulations comprising an antibody of the invention are prepared for storage by mixing the antibody having the desired degree of purity with optional physiologically acceptable carriers, excipients or stabilizers

(*Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 20th edition (2000)), in the form of aqueous solutions, lyophilized or other dried formulations. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, histidine and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (*e.g.*, Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN™, PLURONICS™ or polyethylene glycol (PEG).

[00310] The active ingredients may also be entrapped in microcapsule prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsule and poly-(methylmethacylate) microcapsule, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 20th edition (2000).

[00311] The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

[00312] Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the immunoglobulin of the invention, which matrices are in the form of shaped articles, *e.g.*, films, or microcapsule. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ ethyl-L-glutamate, non-degradable

ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated immunoglobulins remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C, resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulfhydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

Methods

Therapeutic methods

[00313] An antibody of the invention may be used in, for example, *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* therapeutic methods.

[00314] In one aspect, the invention provides methods for treating or preventing a tumor, a cancer, and/or a cell proliferative disorder (*e.g.*, disorder associated with increased expression and/or activity of VEGF) comprising administering an effective amount of an anti-VEGF antibody to a subject in need of such treatment.

[00315] In one aspect, the invention provides methods for reducing, inhibiting, blocking, or preventing growth of a tumor or cancer, the methods comprising administering an effective amount of an anti-VEGF antibody to a subject in need of such treatment.

[00316] In one aspect, the invention provides methods for inhibiting angiogenesis comprising administering an effective amount of an anti-VEGF antibody to a subject in need of such treatment.

[00317] In one aspect, the invention provides methods for inhibiting vascular permeability comprising administering an effective amount of an anti-VEGF antibody to a subject in need of such treatment.

[00318] In one aspect, the invention provides methods for treating a pathological condition associated with angiogenesis comprising administering an effective amount of an anti-VEGF antibody to a subject in need of such treatment. In some embodiments, the pathological condition associated with angiogenesis is a tumor, a cancer, and/or a cell proliferative disorder.

[00319] An antibody of the invention can be administered to a human for therapeutic purposes. In one embodiment, an antibody of the invention is used in a method for binding VEGF in an individual suffering from a disorder associated with increased VEGF expression and/or activity, the method comprising administering to the individual the antibody such that VEGF in the individual is bound. In one embodiment, the VEGF is human VEGF, and the individual is a human individual. Alternatively, the individual can be a mammal expressing VEGF to which an antibody of the invention binds. Still further the individual can be a mammal into which VEGF has been introduced (*e.g.*, by administration of VEGF or by expression of a transgene encoding VEGF).

[00320] In one aspect, at least some of the antibodies of the invention can bind VEGF from species other than human. Accordingly, the antibodies of the invention can be used to bind specific antigen activity, *e.g.*, in a cell culture containing the antigen, in human subjects or in other mammalian subjects having the antigen with which an antibody of the invention cross-reacts (*e.g.*, chimpanzee, baboon, marmoset, cynomolgus and rhesus, pig or mouse). In one embodiment, the antibody of the invention can be used for inhibiting antigen activities by contacting the antibody with the antigen such that antigen activity is inhibited. Preferably, the antigen is a human protein molecule.

[00321] Moreover, an antibody of the invention can be administered to a non-human mammal expressing VEGF with which the antibody cross-reacts (*e.g.*, a primate, pig, rat, or mouse) for veterinary purposes or as an animal model of human disease. Regarding the latter, such animal models may be useful for evaluating the therapeutic efficacy of antibodies of the invention (*e.g.*, testing of dosages and time courses of administration).

[00322] The antibodies of the invention can be used to treat, inhibit, delay progression of, prevent/delay recurrence of, ameliorate, or prevent diseases, disorders or conditions associated with expression and/or activity of one or more antigen molecules.

[00323] The present invention encompasses the prevention and treatment of tumor metastasis and anti-angiogenic cancer therapy, a novel cancer treatment strategy aimed at inhibiting the development of tumor blood vessels required for providing nutrients to support tumor growth. The invention specifically includes inhibiting the neoplastic growth of tumor at the primary site as well as preventing and/or treating metastasis of tumors at the secondary sites, therefore allowing attack of the tumors by other therapeutics. Examples of cancer to be treated (including prevention) herein include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia or lymphoid malignancies. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer (*e.g.*, epithelial squamous cell cancer), lung cancer including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including gastrointestinal cancer and gastrointestinal stromal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, cancer of the urinary tract, hepatoma, breast cancer, colon cancer, rectal cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma, anal carcinoma, penile carcinoma, melanoma, superficial spreading melanoma, lentigo maligna melanoma, acral lentiginous melanomas, nodular melanomas, multiple myeloma and B-cell lymphoma (including low grade/follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL); small lymphocytic (SL) NHL; intermediate grade/follicular NHL; intermediate grade diffuse NHL; high grade immunoblastic NHL; high grade lymphoblastic NHL; high grade small non-cleaved cell NHL; bulky disease NHL; mantle cell lymphoma; AIDS-related lymphoma; and Waldenstrom's Macroglobulinemia); chronic lymphocytic leukemia (CLL); acute lymphoblastic leukemia (ALL); hairy cell leukemia; chronic myeloblastic leukemia; and post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD), as well as abnormal vascular proliferation associated with phakomatoses, edema (such as that associated with brain tumors), Meigs' syndrome, brain, as well as head and neck

cancer, and associated metastases. In certain embodiments, cancers that are amenable to treatment by the antibodies of the invention include breast cancer, colorectal cancer, rectal cancer, non-small cell lung cancer, non-Hodgkins lymphoma (NHL), renal cell cancer, prostate cancer, liver cancer, pancreatic cancer, soft-tissue sarcoma, Kaposi's sarcoma, carcinoid carcinoma, head and neck cancer, ovarian cancer, mesothelioma, and multiple myeloma. In some embodiments, the cancer is selected from the group consisting of small cell lung cancer, neuroblastomas, melanoma, breast carcinoma, gastric cancer, colorectal cancer (CRC), and hepatocellular carcinoma. Yet, in some embodiments, the cancer is selected from the group consisting of non-small cell lung cancer, colorectal cancer and breast carcinoma, including metastatic forms of those cancers.

[00324] In certain embodiments, an immunoconjugate comprising an antibody conjugated with one or more cytotoxic agent(s) is administered to the patient. In some embodiments, the immunoconjugate and/or antigen to which it is bound is/are internalized by the cell, resulting in increased therapeutic efficacy of the immunoconjugate in killing the target cell to which it binds. In one embodiment, the cytotoxic agent targets or interferes with nucleic acid in the target cell. In one embodiment, the cytotoxic agent targets or interferes with microtubule polymerization. Examples of such cytotoxic agents include any of the chemotherapeutic agents noted herein (such as a maytansinoid, auristatin, dolastatin, or a calicheamicin), a radioactive isotope, or a ribonuclease or a DNA endonuclease.

[00325] When the binding target of an antibody is located in the brain, certain embodiments of the invention provide for the antibody to traverse the blood-brain barrier. Several art-known approaches exist for transporting molecules across the blood-brain barrier, including, but not limited to, physical methods, lipid-based methods, stem cell-based methods, and receptor and channel-based methods.

[00326] Physical methods of transporting an antibody across the blood-brain barrier include, but are not limited to, circumventing the blood-brain barrier entirely, or by creating openings in the blood-brain barrier. Circumvention methods include, but are not limited to, direct injection into the brain (see, *e.g.*, Papanastassiou *et al.*, *Gene Therapy* 9: 398-406 (2002)), interstitial infusion/convection-enhanced delivery (see, *e.g.*, Bobo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2076-2080 (1994)), and implanting a delivery device in the brain (see, *e.g.*, Gill *et al.*, *Nature Med.* 9: 589-595

(2003); and Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Methods of creating openings in the barrier include, but are not limited to, ultrasound (see, *e.g.*, U.S. Patent Publication No. 2002/0038086), osmotic pressure (*e.g.*, by administration of hypertonic mannitol (Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989)), permeabilization by, *e.g.*, bradykinin or permeabilizer A-7 (see, *e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,112,596, 5,268,164, 5,506,206, and 5,686,416), and transfection of neurons that straddle the blood-brain barrier with vectors containing genes encoding the antibody (see, *e.g.*, U.S. Patent Publication No. 2003/0083299).

[00327] Lipid-based methods of transporting an antibody across the blood-brain barrier include, but are not limited to, encapsulating the antibody in liposomes that are coupled to antibody binding fragments that bind to receptors on the vascular endothelium of the blood-brain barrier (see, *e.g.*, U.S. Patent Application Publication No. 20020025313), and coating the antibody in low-density lipoprotein particles (see, *e.g.*, U.S. Patent Application Publication No. 20040204354) or apolipoprotein E (see, *e.g.*, U.S. Patent Application Publication No. 20040131692).

[00328] Stem-cell based methods of transporting an antibody across the blood-brain barrier entail genetically engineering neural progenitor cells (NPCs) to express the antibody of interest and then implanting the stem cells into the brain of the individual to be treated. *See* Behrstock *et al.* (2005) *Gene Ther.* 15 Dec. 2005 advanced online publication (reporting that NPCs genetically engineered to express the neurotrophic factor GDNF reduced symptoms of Parkinson disease when implanted into the brains of rodent and primate models).

[00329] Receptor and channel-based methods of transporting an antibody across the blood-brain barrier include, but are not limited to, using glucocorticoid blockers to increase permeability of the blood-brain barrier (see, *e.g.*, U.S. Patent Application Publication Nos. 2002/0065259, 2003/0162695, and 2005/0124533); activating potassium channels (see, *e.g.*, U.S. Patent Application Publication No. 2005/0089473), inhibiting ABC drug transporters (see, *e.g.*, U.S. Patent Application Publication No. 2003/0073713); coating antibodies with a transferrin and modulating activity of the one or more transferrin receptors (see, *e.g.*, U.S. Patent Application Publication No. 2003/0129186), and cationizing the antibodies (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,004,697).

[00330] It is understood that any of the above therapeutic methods may be carried out using an immunoconjugate of the invention in place of or in addition to an anti-VEGF antibody.

Combination therapies

[00331] Antibodies of the invention can be used either alone or in combination with other compositions in a therapy. For instance, an antibody of the invention may be co-administered with another antibody, chemotherapeutic agent(s) (including cocktails of chemotherapeutic agents), other cytotoxic agent(s), anti-angiogenic agent(s), cytokines, and/or growth inhibitory agent(s). Where an antibody of the invention inhibits tumor growth, it may be particularly desirable to combine it with one or more other therapeutic agent(s) which also inhibits tumor growth, *e.g.*, anti-angiogenic agents and/or chemotherapeutic agents. Alternatively, or additionally, the patient may receive combined radiation therapy (*e.g.* external beam irradiation or therapy with a radioactive labeled agent, such as an antibody). Such combined therapies noted above include combined administration (where the two or more agents are included in the same or separate formulations), and separate administration, in which case, administration of the antibody of the invention can occur prior to, and/or following, administration of the adjunct therapy or therapies.

[00332] In one embodiment, an antibody of the invention may be co-administered with at least one additional therapeutic agent and/or adjuvant. For example, anti-VEGF antibodies are used in combinations with anti-cancer therapeutics or anti-neovascularization therapeutics to treat various neoplastic or non-neoplastic conditions. In one embodiment, the neoplastic or non-neoplastic condition is characterized by pathological disorder associated with aberrant or undesired angiogenesis. The anti-VEGF antibody can be administered serially or in combination with another agent that is effective for those purposes, either in the same composition or as separate compositions. Alternatively, or additionally, multiple inhibitors of VEGF can be administered.

[00333] Typically, the anti-VEGF antibodies and anti-cancer agents are suitable for the same or similar diseases to block or reduce a pathological disorder such as a tumor, a cancer or a cell proliferative disorder. In one embodiment the anti-cancer agent is an anti-angiogenic agent.

[00334] Many anti-angiogenic agents have been identified and are known in the arts, including those listed herein, *e.g.*, listed under "Definitions," and by, *e.g.*, Carmeliet and Jain, *Nature* 407:249-257 (2000); Ferrara *et al.*, *Nature Reviews*: Drug Discovery, 3:391-400 (2004); and Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003). See also, US Patent Application US20030055006.

[00335] In one embodiment, an anti-VEGF of the present invention is used in combination with one or more anti-VEGF neutralizing antibody (or fragment), antagonist to another VEGF family (*e.g.*, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, placental growth factor (PLGF)) or a VEGF receptor antagonist including, but not limited to, for example, soluble VEGF receptor (*e.g.*, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropillins (*e.g.*, NRP1, NRP2)) fragments, aptamers capable of blocking VEGF or VEGFR, neutralizing anti-VEGFR antibodies, low molecule weight inhibitors of VEGFR tyrosine kinases (RTK), antisense strategies for VEGF, ribozymes against VEGF or VEGF receptors, antagonist variants of VEGF; and any combinations thereof.

[00336] In another embodiment, the anti-VEGF antibody of the invention can be used in combination with small molecule receptor tyrosine kinase inhibitors (RTKIs) that target one or more tyrosine kinase receptors such as VEGF receptors, FGF receptors, EGF receptors and PDGF receptors. Many therapeutic small molecule RTKIs are known in the art, including, but are not limited to, vatalanib (PTK787), erlotinib (TARCEVA®), OSI-7904, ZD6474 (ZACTIMA®), ZD6126 (ANG453), ZD1839, sunitinib (SUTENT®), semaxanib (SU5416), AMG706, AG013736, Imatinib (GLEEVEC®), MLN-518, CEP-701, PKC- 412, Lapatinib (GSK572016), VELCADE®, AZD2171, sorafenib (NEXAVAR®), XL880, and CHIR-265.

[00337] Other therapeutic agents useful for combination tumor therapy with the antibody of the invention include antagonist of other factors that are involved in tumor growth, such as EGFR, ErbB2 (also known as Her2) ErbB3, ErbB4, or TNF.

[00338] In certain embodiments, two or more angiogenesis inhibitors may optionally be co-administered to the patient in addition to VEGF antagonist and other agent. In yet another embodiment, one or more additional therapeutic agents, *e.g.*, anti-cancer agents, can be administered in combination with an anti-VEGF antibody of the present invention, an antagonist to another VEGF family, and/or an anti-angiogenic agent.

[00339] In certain aspects of the invention, other therapeutic agents useful for combination tumor therapy with an anti-VEGF-antibody include other cancer therapies, (*e.g.*, surgery, radiological treatments (*e.g.*, involving irradiation or administration of radioactive substances), chemotherapy, treatment with anti-cancer agents listed herein and known in the art, or combinations thereof). An exemplary and non-limiting list of chemotherapeutic agents contemplated is provided herein under "Definitions."

[00340] Alternatively, or additionally, two or more antibodies binding the same or two or more different antigens disclosed herein can be co-administered to the patient. Sometimes, it may be beneficial to also administer one or more cytokines to the patient.

[00341] The effective amounts of therapeutic agents administered in combination with an anti-VEGF antibody will be at the physician's or veterinarian's discretion. Dosage administration and adjustment is done to achieve maximal management of the conditions to be treated. The dose will additionally depend on such factors as the type of therapeutic agent to be used and the specific patient being treated. Suitable dosages for the anti-cancer agent are those presently used and can be lowered due to the combined action (synergy) of the anti-cancer agent and the anti-VEGF antibody. In certain embodiments, the combination of the inhibitors potentiates the efficacy of a single inhibitor. The term "potentiate" refers to an improvement in the efficacy of a therapeutic agent at its common or approved dose. See also the section entitled *Pharmaceutical formulations and dosages* herein.

Chemotherapeutic agents

[00342] In one aspect, the invention provides a method of treating a disorder (such as a tumor, a cancer, or a cell proliferative disorder) by administering effective amounts of an anti-VEGF antibody and/or an angiogenesis inhibitor(s) and one or more chemotherapeutic agents. A variety of chemotherapeutic agents may be used in the combined treatment methods of the invention. An exemplary and non-limiting list of chemotherapeutic agents contemplated is provided herein under "Definitions." The administration of the anti-VEGF antibody and the chemotherapeutic agent can be done simultaneously, *e.g.*, as a single composition or as two or more distinct compositions, using the same or different administration routes. Alternatively, or additionally, the administration can be done sequentially, in

any order. Alternatively, or additionally, the steps can be performed as a combination of both sequentially and simultaneously, in any order. In certain embodiments, intervals ranging from minutes to days, to weeks to months, can be present between the administrations of the two or more compositions. For example, the chemotherapeutic agent may be administered first, followed by the anti-VEGF antibody. However, simultaneous administration or administration of the anti-VEGF antibody first is also contemplated. Accordingly, in one aspect, the invention provides methods comprising administration of an anti-VEGF antibody (such as B20-4.1.1 antibody or B20-4.1.1RR antibody), followed by administration of a chemotherapeutic agent. In certain embodiments, intervals ranging from minutes to days, to weeks to months, can be present between the administrations of the two or more compositions.

[00343] As will be understood by those of ordinary skill in the art, the appropriate doses of chemotherapeutic agents will be generally around those already employed in clinical therapies wherein the chemotherapeutics are administered alone or in combination with other chemotherapeutics. Variation in dosage will likely occur depending on the condition being treated. The physician administering treatment will be able to determine the appropriate dose for the individual subject.

Relapse tumor growth

[00344] The invention also provides methods and compositions for inhibiting or preventing relapse tumor growth or relapse cancer cell growth. Relapse tumor growth or relapse cancer cell growth is used to describe a condition in which patients undergoing or treated with one or more currently available therapies (*e.g.*, cancer therapies, such as chemotherapy, radiation therapy, surgery, hormonal therapy and/or biological therapy/immunotherapy, anti-VEGF antibody therapy, particularly a standard therapeutic regimen for the particular cancer) is not clinically adequate to treat the patients or the patients are no longer receiving any beneficial effect from the therapy such that these patients need additional effective therapy. As used herein, the phrase can also refer to a condition of the "non-responsive/refractory" patient, *e.g.*, which describe patients who respond to therapy yet suffer from side effects, develop resistance, do not respond to the therapy, do not respond satisfactorily to the therapy, etc. In various embodiments, a cancer is relapse tumor growth or relapse cancer cell

growth where the number of cancer cells has not been significantly reduced, or has increased, or tumor size has not been significantly reduced, or has increased, or fails any further reduction in size or in number of cancer cells. The determination of whether the cancer cells are relapse tumor growth or relapse cancer cell growth can be made either in vivo or in vitro by any method known in the art for assaying the effectiveness of treatment on cancer cells, using the art-accepted meanings of "relapse" or "refractory" or "non-responsive" in such a context. A tumor resistant to anti-VEGF treatment is an example of a relapse tumor growth.

[00345] The invention provides methods of blocking or reducing relapse tumor growth or relapse cancer cell growth in a subject by administering one or more anti-VEGF antibody of the present invention to block or reduce the relapse tumor growth or relapse cancer cell growth in subject. In certain embodiments, the antibody can be administered subsequent to the cancer therapeutic. In certain embodiments, the anti-VEGF antibodies are administered simultaneously with cancer therapy. Alternatively, or additionally, the anti-VEGF antibody therapy alternates with another cancer therapy, which can be performed in any order. The invention also encompasses methods for administering one or more inhibitory antibodies to prevent the onset or recurrence of cancer in patients predisposed to having cancer. Generally, the subject was or is concurrently undergoing cancer therapy. In one embodiment, the cancer therapy is treatment with an anti-angiogenesis agent, *e.g.*, a VEGF-C antagonist. The anti-angiogenesis agent includes, but not limited to, those known in the art and those found under the "Definitions" herein. In one embodiment, the anti-angiogenesis agent is an anti-VEGF neutralizing antibody or fragment (*e.g.*, humanized A4.6.1, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). See, *e.g.*, U.S. Patents 6,582,959, 6,884,879, 6,703,020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; US Patent Applications 20030206899, 20030190317, 20030203409, and 20050112126; Popkov *et al.*, Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004); and, WO2005012359. Additional agents can be administered in combination with anti-VEGF antibody for blocking or reducing relapse tumor growth or relapse cancer cell growth, *e.g.*, see section entitled Combination Therapies herein.

Diagnostic methods and methods of detection

[00346] In one aspect, the invention provides a method of diagnosing a disorder associated with increased expression of VEGF. In certain embodiments, the method comprises contacting a test cell with an anti-VEGF antibody; determining the level of expression (either quantitatively or qualitatively) of VEGF by the test cell by detecting binding of the anti-VEGF antibody to VEGF; and comparing the level of expression of VEGF by the test cell with the level of expression of VEGF by a control cell (*e.g.*, a normal cell of the same tissue origin as the test cell or a cell that expresses VEGF at levels comparable to such a normal cell), wherein a higher level of expression of VEGF by the test cell as compared to the control cell indicates the presence of a disorder associated with increased expression of VEGF. In certain embodiments, the test cell is obtained from an individual suspected of having a disorder associated with increased expression of VEGF. In certain embodiments, the disorder is a tumor, cancer, and/or cell proliferative disorder.

[00347] Exemplary disorders that may be diagnosed using an antibody of the invention include, but not limited to, squamous cell cancer, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung, squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric cancer, gastrointestinal cancer, gastrointestinal stromal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, liver cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma and various types of head and neck cancer, melanoma, superficial spreading melanoma, lentigo maligna melanoma, acral lentiginous melanomas, nodular melanomas, B-cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia (CLL); acute lymphoblastic leukemia (ALL); Hairy cell leukemia; chronic myeloblastic leukemia; post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD), abnormal vascular proliferation associated with phakomatoses, edema associated with brain tumors, and Meigs' syndrome.

[00348] In another aspect, the invention provides a complex of any of the anti-VEGF antibodies described herein and VEGF. In some embodiments, the complex is *in vivo* or *in vitro*. In some embodiments, the complex comprises a cancer cell.

[00349] In another aspect, the invention provides a method of detecting the presence of VEGF in a biological sample. The term "detecting" as used herein encompasses quantitative or qualitative detection.

[00350] In certain embodiments, the method comprises contacting the biological sample with an anti-VEGF antibody under conditions permissive for binding of the anti-VEGF antibody to VEGF, and detecting whether a complex is formed between the anti-VEGF antibody and VEGF.

[00351] Anti-VEGF antibodies can be used for the detection of VEGF in any one of a number of well known detection assay methods. For example, a biological sample may be assayed for VEGF by obtaining the sample from a desired source, admixing the sample with anti-VEGF antibody to allow the antibody to form antibody/VEGF complex with any VEGF present in the mixture, and detecting any antibody/VEGF complex present in the mixture. The biological sample may be prepared for assay by methods known in the art which are suitable for the particular sample. The methods of admixing the sample with antibodies and the methods of detecting antibody/VEGF complex are chosen according to the type of assay used.

[00352] Analytical methods for VEGF all use one or more of the following reagents: labeled VEGF analogue, immobilized VEGF analogue, labeled anti-VEGF antibody, immobilized anti-VEGF antibody and/or steric conjugates. The labeled reagents also are known as "tracers."

[00353] In certain embodiments, the anti-VEGF antibody is detectably labeled. The label used is any detectable functionality that does not interfere with the binding of VEGF and anti-VEGF antibody. Labels include, but are not limited to, labels or moieties that are detected directly (such as fluorescent, chromophoric, electron-dense, chemiluminescent, and radioactive labels), as well as moieties, such as enzymes or ligands, that are detected indirectly, *e.g.*, through an enzymatic reaction or molecular interaction. Exemplary labels include, but are not limited to, the radioisotopes ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, and ^{131}I, fluorophores such as rare earth chelates or fluorescein and its derivatives, rhodamine and its derivatives, dansyl, umbelliferone, luceriferases, *e.g.*, firefly luciferase and bacterial luciferase (U.S. Pat. No. 4,737,456), luciferin, 2,3-dihydrophthalazinediones, horseradish peroxidase (HRP), alkaline phosphatase, β-galactosidase, glucoamylase, lysozyme, saccharide oxidases, *e.g.*, glucose oxidase, galactose oxidase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase,

heterocyclic oxidases such as uricase and xanthine oxidase, coupled with an enzyme that employs hydrogen peroxide to oxidize a dye precursor such as HRP, lactoperoxidase, or microperoxidase, biotin/avidin, spin labels, bacteriophage labels, stable free radicals, and the like.

[00354] Conventional methods are available to bind these labels covalently to proteins or polypeptides. For instance, coupling agents such as dialdehydes, carbodiimides, dimaleimides, bis-imidates, bis-diazotized benzidine, and the like may be used to tag the antibodies with the above-described fluorescent, chemiluminescent, and enzyme labels. See, for example, U.S. Pat. Nos. 3,940,475 (fluorimetry) and 3,645,090 (enzymes); Hunter *et al.*, *Nature*, 144: 945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry,* 13: 1014-1021 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981); and Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982). Preferred labels herein are enzymes such as horseradish peroxidase and alkaline phosphatase. The conjugation of such label, including the enzymes, to the antibody is a standard manipulative procedure for one of ordinary skill in immunoassay techniques. See, for example, O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166.

[00355] In certain embodiments, antibodies are immobilized on an insoluble matrix. Immobilization may entail separating an anti-VEGF antibody from any VEGF that remains free in solution. This conventionally is accomplished by either insolubilizing the anti-VEGF antibody before the assay procedure, as by adsorption to a water-insoluble matrix or surface (Bennich *et al.*, U.S. 3,720,760), or by covalent coupling (for example, using glutaraldehyde cross-linking), or by insolubilizing the anti-VEGF antibody after formation of a complex between the anti-VEGF antibody and VEGF, *e.g.*, by immunoprecipitation.

[00356] Assays used to detect binding of anti-VEGF antibodies to VEGF include, but not limited to, antigen-binding assays that are well known in the art, such as western blots, radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), competitive and "sandwich" assays, immunoprecipitation assays, fluorescent immunoassays, protein A immunoassays, immunohistochemistry (IHC) and steric inhibition assays.

[00357] In one embodiment, the expression of proteins in a sample may be examined using immunohistochemistry and staining protocols. Immunohistochemical staining of tissue sections has been shown to be a reliable method of assessing or detecting presence of proteins in a sample. Immunohistochemistry ("IHC") techniques utilize an antibody to probe and visualize cellular antigens *in situ*, generally by chromogenic or fluorescent methods. For sample preparation, a tissue or cell sample from a mammal (typically a human patient) may be used. Examples of samples include, but are not limited to, cancer cells such as colon, breast, prostate, ovary, lung, stomach, pancreas, lymphoma, and leukemia cancer cells. The sample can be obtained by a variety of procedures known in the art including, but not limited to surgical excision, aspiration or biopsy. The tissue may be fresh or frozen. In one embodiment, the sample is fixed and embedded in paraffin or the like. The tissue sample may be fixed (*i.e.*, preserved) by conventional methodology. One of ordinary skill in the art will appreciate that the choice of a fixative is determined by the purpose for which the sample is to be histologically stained or otherwise analyzed. One of ordinary skill in the art will also appreciate that the length of fixation depends upon the size of the tissue sample and the fixative used.

[00358] IHC may be performed in combination with additional techniques such as morphological staining and/or fluorescence *in-situ* hybridization. Two general methods of IHC are available; direct and indirect assays. According to the first assay, binding of antibody to the target antigen (*e.g.*, VEGF) is determined directly. This direct assay uses a labeled reagent, such as a fluorescent tag or an enzyme-labeled primary antibody, which can be visualized without further antibody interaction. In a typical indirect assay, unconjugated primary antibody binds to the antigen and then a labeled secondary antibody binds to the primary antibody. Where the secondary antibody is conjugated to an enzymatic label, a chromogenic or fluorogenic substrate is added to provide visualization of the antigen. Signal amplification occurs because several secondary antibodies may react with different epitopes on the primary antibody. The primary and/or secondary antibody used for immunohistochemistry typically will be labeled with a detectable moiety.

[00359] Aside from the sample preparation procedures discussed above, further treatment of the tissue section prior to, during or following IHC may be desired. For example, epitope retrieval methods, such as heating the tissue sample in

citrate buffer may be carried out (see, *e.g.*, Leong *et al. Appl. Immunohistochem.* 4(3):201 (1996)).

[00360] Following an optional blocking step, the tissue section is exposed to primary antibody for a sufficient period of time and under suitable conditions such that the primary antibody binds to the target protein antigen in the tissue sample. Appropriate conditions for achieving this can be determined by routine experimentation. The extent of binding of antibody to the sample is determined by using any one of the detectable labels discussed above. Preferably, the label is an enzymatic label (*e.g.*, HRPO) which catalyzes a chemical alteration of the chromogenic substrate such as 3,3'-diaminobenzidine chromogen. Preferably the enzymatic label is conjugated to antibody which binds specifically to the primary antibody (*e.g.*, the primary antibody is rabbit polyclonal antibody and secondary antibody is goat anti-rabbit antibody).

[00361] Specimens thus prepared may be mounted and coverslipped. Slide evaluation is then determined, *e.g.*, using a microscope, and staining intensity criteria, routinely used in the art, may be employed. Staining intensity criteria may be evaluated as follows:

TABLE 2

Staining Pattern	Score
No staining is observed in cells.	0
Faint/barely perceptible staining is detected in more than 10% of the cells.	1+
Weak to moderate staining is observed in more than 10% of the cells.	2+
Moderate to strong staining is observed in more than 10% of the cells.	3+

[00362] Typically, a staining pattern score of about 2+ or higher in an IHC assay is diagnostic and/or prognostic. In some embodiments, a staining pattern score of about 1+ or higher is diagnostic and/or prognostic. In other embodiments, a staining pattern score of about 3 of higher is diagnostic and/or prognostic. It is understood that when cells and/or tissue from a tumor or colon adenoma are examined

using IHC, staining is generally determined or assessed in tumor cell and/or tissue (as opposed to stromal or surrounding tissue that may be present in the sample).

[00363] Other assay methods, known as competitive or sandwich assays, are well established and widely used in the commercial diagnostics industry.

[00364] Competitive assays rely on the ability of a tracer VEGF analogue to compete with the test sample VEGF for a limited number of anti-VEGF antibody antigen-binding sites. The anti-VEGF antibody generally is insolubilized before or after the competition and then the tracer and VEGF bound to the anti-VEGF antibody are separated from the unbound tracer and VEGF. This separation is accomplished by decanting (where the binding partner was preinsolubilized) or by centrifuging (where the binding partner was precipitated after the competitive reaction). The amount of test sample VEGF is inversely proportional to the amount of bound tracer as measured by the amount of marker substance. Dose-response curves with known amounts of VEGF are prepared and compared with the test results to quantitatively determine the amount of VEGF present in the test sample. These assays are called ELISA systems when enzymes are used as the detectable markers.

[00365] Another species of competitive assay, called a "homogeneous" assay, does not require a phase separation. Here, a conjugate of an enzyme with the VEGF is prepared and used such that when anti-VEGF antibody binds to the VEGF the presence of the anti-VEGF antibody modifies the enzyme activity. In this case, the VEGF or its immunologically active fragments are conjugated with a bifunctional organic bridge to an enzyme such as peroxidase. Conjugates are selected for use with anti-VEGF antibody so that binding of the anti-VEGF antibody inhibits or potentiates the enzyme activity of the label. This method *per se* is widely practiced under the name of EMIT.

[00366] Steric conjugates are used in steric hindrance methods for homogeneous assay. These conjugates are synthesized by covalently linking a low-molecular-weight hapten to a small VEGF fragment so that antibody to hapten is substantially unable to bind the conjugate at the same time as anti-VEGF antibody. Under this assay procedure the VEGF present in the test sample will bind anti-VEGF antibody, thereby allowing anti-hapten to bind the conjugate, resulting in a change in the character of the conjugate hapten, *e.g.*, a change in fluorescence when the hapten is a fluorophore.

[00367] Sandwich assays particularly are useful for the determination of VEGF or anti-VEGF antibodies. In sequential sandwich assays an immobilized anti-VEGF antibody is used to adsorb test sample VEGF, the test sample is removed as by washing, the bound VEGF is used to adsorb a second, labeled anti-VEGF antibody and bound material is then separated from residual tracer. The amount of bound tracer is directly proportional to test sample VEGF. In "simultaneous" sandwich assays the test sample is not separated before adding the labeled anti-VEGF. A sequential sandwich assay using an anti-VEGF monoclonal antibody as one antibody and a polyclonal anti-VEGF antibody as the other is useful in testing samples for VEGF.

[00368] The foregoing are merely exemplary detection assays for VEGF. Other methods now or hereafter developed that use anti-VEGF antibody for the determination of VEGF are included within the scope hereof.

[00369] It is understood that any of the above embodiments of diagnosis or detection may be carried out using an immunoconjugate of the invention in place of or in addition to an anti-VEGF antibody.

Articles of manufacture

[00370] In another aspect of the invention, an article of manufacture containing materials useful for the treatment, prevention and/or diagnosis of the disorders described above is provided. The article of manufacture comprises a container and a label or package insert on or associated with the container. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, etc. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition which is by itself or combined with another composition effective for treating, preventing and/or diagnosing the condition and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). At least one active agent in the composition is an antibody or immunoconjugate of the invention. The label or package insert indicates that the composition is used for treating the condition of choice. Moreover, the article of manufacture may comprise (a) a first container with a composition contained therein, wherein the composition comprises an antibody or immunoconjugate of the invention; and (b) a second container with a composition

contained therein, wherein the composition comprises a further cytotoxic or otherwise therapeutic agent. The article of manufacture in this embodiment of the invention may further comprise a package insert indicating that the compositions can be used to treat a particular condition. Alternatively, or additionally, the article of manufacture may further comprise a second (or third) container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as bacteriostatic water for injection (BWFI), phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, and syringes.

[00371] The following examples are intended merely to illustrate the practice of the present invention and are not provided by way of limitation. The disclosures of all patent and scientific literatures cited herein are expressly incorporated in their entirety by reference.

EXAMPLES

Example 1

Generation and characterization of anti-VEGF antibodies

[00372] Synthetic phage antibody libraries were built on a single framework (humanized anti-ErbB2 antibody, 4D5) by introducing diversity within the complementarity-determining regions (CDRs) of heavy and light chains (Lee, C. V. *et al. J Mol Biol* 340, 1073-93 (2004)). In brief, phage-displayed synthetic antibody libraries were built on a single human framework by introducing synthetic diversity at solvent-exposed positions within the heavy chain complementarity-determining regions (CDRs). To improve library performance, monovalent and bivalent antigen-binding fragment (Fab) libraries were constructed, and explored different CDR-H3 diversities by varying the amino acid composition and CDR length. The library was then expanded by increasing the variability of CDR-H3 length and using tailored codons that mimicked the amino acid composition of natural CDR-H3 sequences. Using these libraries with completely synthetic CDRs displayed on a single scaffold high affinity antibodies were generated. For further details of strategies and methods for generating synthetic antibody libraries with single template, see, *e.g.*, WO 2005/012359 published February 10, 2005, the entire disclosure of which is expressly incorporated herein by reference.

[00373] Solution phase panning with naïve libraries was performed against biotinylated murine VEGF in solution and then captured by 5ug/ml neutravidin immobilized on MaxiSorp™ immunoplates. After three rounds of selection with decreasing concentration of biotinylated murine VEGF, clones were randomly picked and specific binders were identified using phage ELISA. For each positive phage clone, variable regions of heavy and light chains were subcloned into pRK expression vectors that were engineered to express full-length IgG chains. Heavy chain and light chain constructs were co-transfected into 293 or CHO cells, and the expressed antibodies were purified from serum-free medium using protein A affinity column. For affinity maturation, phage libraries with different combination of CDR loops (CDR-H1 and H2, CDR-L1, L2 and L3) derived from the initial clone of interest were constructed by soft randomization strategy so that each selected position was mutated to a non-wild type residue or maintained as wild type at about 50:50 frequency (Lee, C. V *et al., Blood,* 108:3103-3111, 2006). High affinity clones were then identified through four rounds of solution phase panning against biotinylated human VEGF as described. Decreasing biotinylated antigen concentration allowed more stringency in panning.

Example 2

Anti-VEGF antibodies binding affinities

[00374] To determine binding affinities of anti-VEGF IgGs, surface plasmon resonance (SRP) measurement with a BIAcore™-3000 instrument was used. Carboxymethylated dextran biosensor chips (CM5, BIAcore Inc.) were activated with *N*-ethyl-*N'*- (3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) according to the supplier's instructions. Human or murine VEGF was immobilized to achieve approximately 60 response units (RU) of coupled protein. See Figure 10. For kinetics measurements, two-fold serial dilutions of anti-VEGF IgG (7.8 nM to 500 nM) were injected separately in PBT buffer (PBS with 0.05% (v/v) Tween 20) at 37°C with a flow rate of 25 µl/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) were calculated using a bivalent binding model (BIAcore Evaluation Software version 3.2). The equilibrium dissociation constant (K_D) was calculated as the ratio k_{off}/k_{on}.

[00375] Due to the unmeaureable off-rate of B20.4.1, IgGs were immobilized to achieve approximately 1000 response units (RU) of coupled protein.

See Figure 11. Two-fold serial dilutions of human or murine VEGF (7.8nM to 500nM) were injected in PBT buffer (PBS with 0.05% (v/v) Tween 20) at 37°C with a flow rate of 25μl/min. Association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) were calculated using a simple one to one Langmuir binding model (BIAcore Evaluation Software version 3.2). to obtain the equilibrium dissociation constant (K_D).

Example 3

HUVEC thymidine incorporation assay

[00376] To study the function of anti-VEGF antibodies by inhibiting VEGF-induced cell proliferation, HUVEC thymidine incorporation assay was performed. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (Clontech, Mountain View, CA) were grown and assayed as described. Approximately 3000 HUVECs were plated in each well of the 96-well cell culture plate and incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 medium supplemented with 1.5% (v/v) fetal bovine serum (assay medium) for 18 hours. Fresh assay medium with fixed amounts of human VEGF (0.1 nM final concentration), determined by first titrating VEGF that can stimulate submaximal DNA synthesis, and increasing concentrations of anti-VEGF IgGs were then added to the cells. After incubation at 37°C for 18 hours, cells were pulsed with 0.5 μCi/well of [^{3}H] thymidine for 24 hours and harvested for counting with TopCount Microplate Scintillation counter as described.

[00377] The HUVEC thymidine incorporation assay shows that B20 variants can effectively inhibit the HUVEC cell proliferation. Figure 12 shows that B20-4.1.1 and B20-4.1.1RR have similar inhibition as G6-31.

Example 4

Endothelial cell proliferation assay

[00378] To determine binding specificity and blocking activity of B20-4.1.1, a cell-based assay using bovine retinal microvascular endothelial cells (BRMEs) was performed, wherein the antibody was tested for its ability to block human or murine VEGF-induced cell proliferation. BRMEs were seeded at a density of 500 cells/well in 96-well plates in growth medium (low-glucose DMEM supplemented with 10% calf serum, 2 mM glutamine, and antibiotics). For the inhibition assay, B20-4.1.1 was added at the indicated concentration (ng/ml) to triplicate wells (Figure 13). After 0.5 hours, human VEGF-A (hVEGF) or mouse

VEGF-A (mVEGF) was added to a final concentration of 6 ng/ml. After six to seven days, cell growth was determined by Alamar blue (BioSource; Invitrogen). Fluorescence was monitored at 530 nm excitation wavelength and 590 nm emission wavelength.

[00379] As shown in Figure 13, B20-4.1.1 reduced the ability of both hVEGF and mVEGF to promote BRME proliferation. As shown in Figure 16, the avastin antibody reduced the ability of hVEGF to promote BRME proliferation. The avastin antibody did not inhibit mVEGF-induced proliferation as inhibition of mVEGF was not observed at a concentration of up to 1500 nM of the avastin antibody.

Example 5

Tumor inhibition in vivo studies

[00380] A549 cells (human lung cancer cells) and MDA-MB231 cells (human breast cancer cells) were grown in cell culture and were injected subcutaneously into 8- to 12-week-old beige nude mice at a cell density of ~ 5 x 10^6 cells/mouse. Forty-eight hours after tumor cell inoculation or when the tumor reached approximately 200 mm^3 in size, mice (n=10) were injected intraperitoneally with B20-4.1.1 at a concentration of 5 mg/kg or with vehicle buffer. Antibodies were administered twice weekly thereafter. Tumor volumes were measured with calipers at the indicated time points.

[00381] As shown in Figures 14 and 15, B20-4.1.1 was effective in reducing tumor volumes in mice injected with either A549 cells (Figure 14) or MDA-MB231 cells (Figure 15).

[00382] Although in the foregoing description the invention is illustrated with reference to certain embodiments, it is not so limited. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

WHAT IS CLAIMED:

1. An isolated anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody wherein the antibody comprises six HVRs selected from:

(i) an HVR-L1 comprising the amino acid sequence of $X_1X_2R\ X_3SL$ wherein the HVR-L1 comprises 1, 2 or 3 substitutions in any combination of the following positions: X_1 is G or A; X_2 is V or I; and/or X_3 is T or R;

(ii) an HVR-L2 comprising the amino acid sequence of DASSLA (SEQ ID NO:6);

(iii) an HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SYKSPL (SEQ ID NO:7);

(iv) an HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SISGSWIF (SEQ ID NO:1);

(v) an HVR-H2 comprising the amino acid sequence of GAIWPFGGYTH (SEQ ID NO:2).; and

(vi) an HVR-H3 comprising the amino acid sequence of RWGHSTSPWAMDY (SEQ ID NO:3).

2. An isolated anti-VEGF antibody, wherein the antibody comprises:

(1) an HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1;

(2) an HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2;

(3) an HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3

(4) an HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4;

(5) an HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:6; and

(6) an HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:7.

3. An isolated anti-VEGF antibody, wherein the antibody comprises:

(1) an HVR-H1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1;

(2) an HVR-H2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2;

(3) an HVR-H3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3

(4) an HVR-L1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:5;

(5) an HVR-L2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:6; and

(6) an HVR-L3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:7.

4. An isolated anti-VEGF antibody, wherein the light chain variable domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:44 or 45.

5. An isolated anti-VEGF antibody wherein the heavy chain variable domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:43, and the light chain variable domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:44 or 45.

6. The antibody of claim 5, wherein the heavy chain variable domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:43, and the light chain variable domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:44.

7. The antibody of claim 5, wherein the heavy chain variable domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:43, and the light chain variable domain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:45.

8. The antibody of any one of claims 1-7, wherein the antibody is a monoclonal antibody.

9. The antibody of any one of claims 1-7, wherein the antibody is humanized.

10. The antibody of any one of claims 1-7, wherein the antibody is human.

11. The antibody of any one of claims 1-7, wherein at least a portion of the framework sequence is a human consensus framework sequence.

12. A polynucleotide encoding the antibody of any one of claims 1-7.

13. A vector comprising the polynucleotide of claim 12.

14. The vector of claim 13, wherein the vector is an expression vector.

15. A host cell comprising the vector of claim 13 or 14.

16. The host cell of claim 15, wherein the host cell is prokaryotic.

17. The host cell of claim 15, wherein the host cell is eukaryotic.

18. The host cell of claim 15, wherein the host cell is mammalian.

19. A method for making an anti-VEGF antibody, said method comprising (a) expressing the vector of claim 14 in a suitable host cell, and (b) recovering the antibody.

20. A method for making an anti-VEGF immunoconjugate, said method comprising (a) expressing the vector of claim 14 in a suitable host cell, and (b) recovering the antibody.

21. The method of claim 19 or 20, wherein the host cell is prokaryotic.

22. The method of claim 19 or 20, wherein the host cell is eukaryotic.

23. A composition comprising the anti-VEGF antibody of any one of claims 1-7.

24. A composition comprising the polynucleotide of any one of claims 12-14.

25. The composition of claim 23 or 24, wherein the composition further comprises a carrier.

26. A method for detection of VEGF, the method comprising detecting VEGF-anti-VEGF antibody complex in a biological sample wherein the amino acid sequence of the anti-VEGF antibody comprises a heavy chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:43, and a light chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 44 or 45.

27. The method of claim 26 wherein the amino acid sequence of the anti-VEGF antibody comprises a heavy chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:43, and a light chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:44.

28. The method of claim 26 wherein the amino acid sequence of the anti-VEGF antibody comprises a heavy chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:43, and a light chain variable domain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:45.

29. The method of any one of claims 26-28, wherein the anti-VEGF antibody is detectably labeled.

30. A method for treating a tumor, cancer, or cell proliferative disorder comprising administering an effective amount of the anti-VEGF antibody of any one of claims 1-7 to a subject in need of such treatment, whereby the tumor, cancer or cell proliferative disorder is treated.

31. The method of claim 30, wherein the subject is human.

32. The method of claim 30, wherein the tumor, cancer, or cell proliferative disorder is colon cancer, lung cancer, breast cancer, or glioblastoma.

33. A method for inhibiting angiogenesis in a subject comprising administering to the subject an effective amount of the anti-VEGF antibody of any one of claims 1-7.

34. A method for inhibiting vascular permeability comprising administering to a subject an effective amount of the anti-VEGF antibody of any one of claims 1-7.

Clone #	H1							
	28	29	30	31	32	33	34	35
B20-4.1.1	S	I	S	G	S	W	I	F
B20-4.1.1RR	S	I	S	G	S	W	I	F

SEQ ID NO.: 1

Clone #	H2										
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58
B20-4.1.1	G	A	I	W	P	F	G	G	Y	T	H
B20-4.1.1RR	G	A	I	W	P	F	G	G	Y	T	H

SEQ ID NO.: 2

Clone #	H3												
	94	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	101	102
B20-4.1.1	R	W	G	H	S	T	S	P	W	A	M	D	Y
B20-4.1.1RR	R	W	G	H	S	T	S	P	W	A	M	D	Y

SEQ ID NO.: 3

Clone #	L1					
	28	29	30	31	32	33
B20-4.1.1	G	V	R	T	S	L
B20-4.1.1RR	A	I	R	R	S	L

SEQ ID NO.: 4

SEQ ID NO.: 5

Clone #	L2					
	50	51	52	53	54	55
B20-4.1.1	D	A	S	S	L	A
B20-4.1.1RR	D	A	S	S	L	A

SEQ ID NO.: 6

Clone #	L3					
	91	92	93	94	95	96
B20-4.1.1	S	Y	K	S	P	L
B20-4.1.1RR	S	Y	K	S	P	L

SEQ ID NO.: 7

FIG. 1

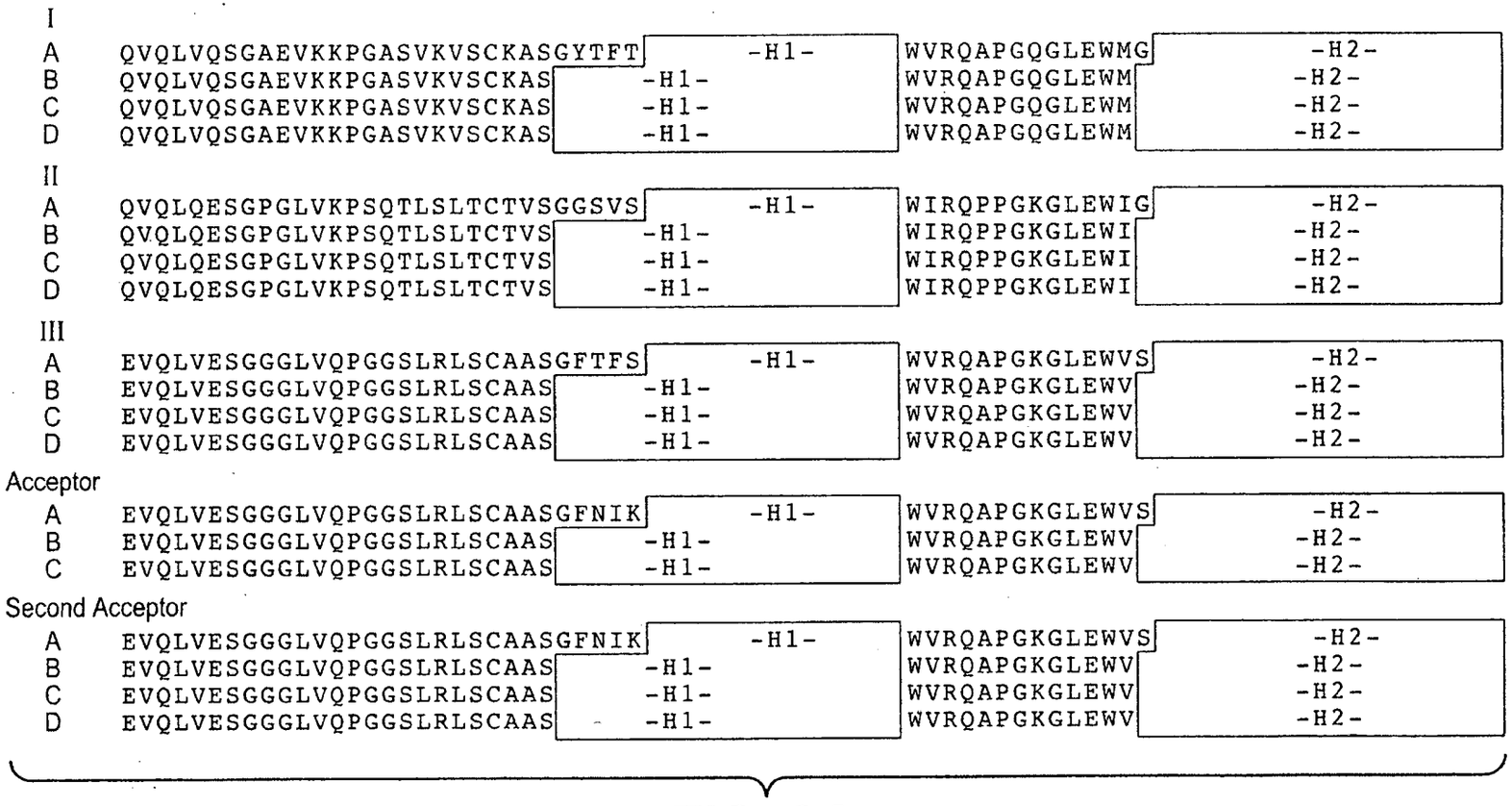

I
A QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT -H1- WVRQAPGQGLEWMG -H2-
B QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2-
C QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2-
D QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2-
II
A QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSVS -H1- WIRQPPGKGLEWIG -H2-
B QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2-
C QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2-
D QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2-
III
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
Acceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
Second Acceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-

FIG. 2A

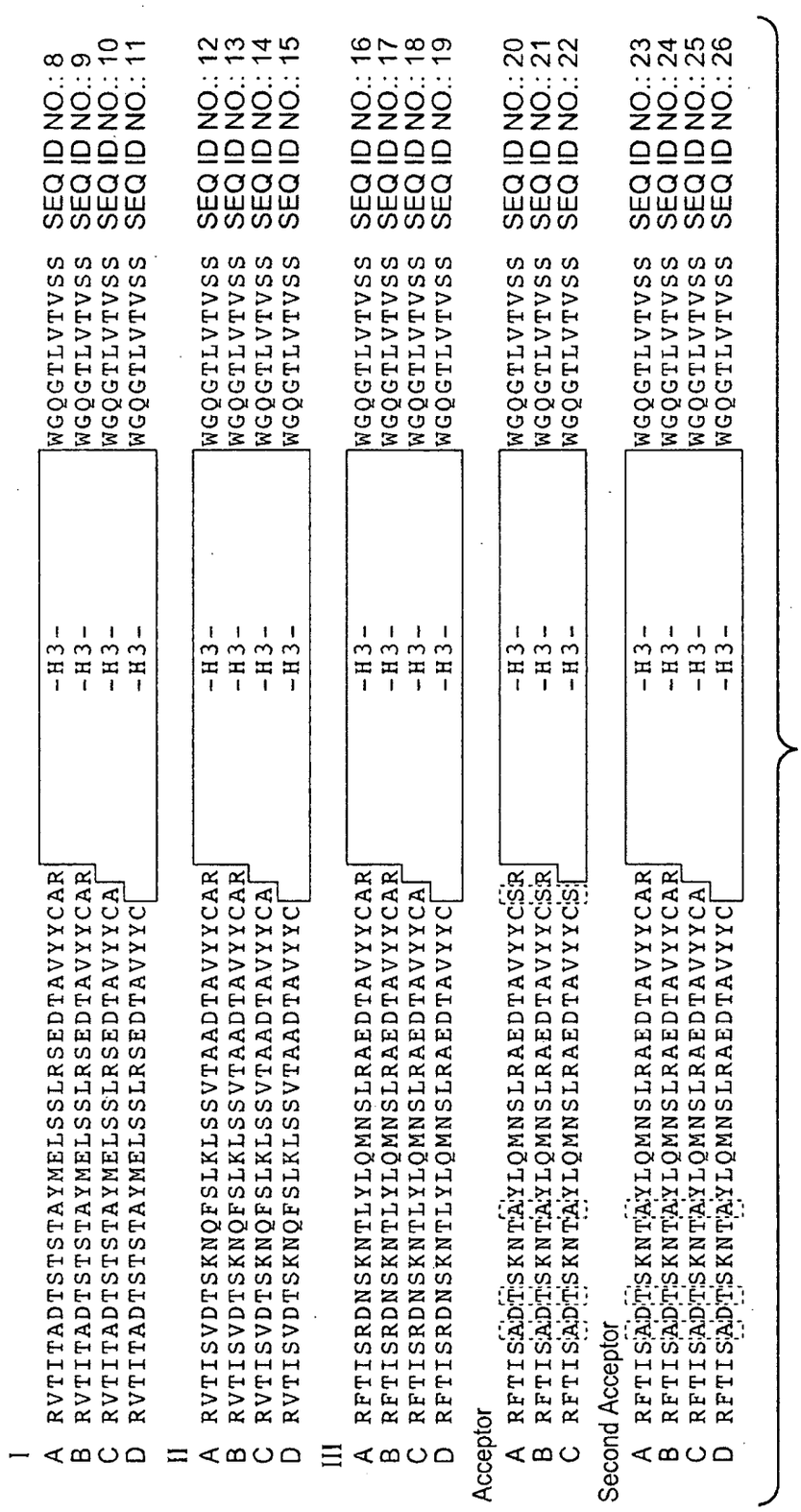

I
A RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 8
B RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 9
C RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 10
D RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 11
II
A RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 12
B RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 13
C RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 14
D RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 15
III
A RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 16
B RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 17
C RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 18
D RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 19
Acceptor
A RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 20
B RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 21
C RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 22
Second Acceptor
A RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 23
B RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 24
C RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 25
D RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 26

FIG. 2B

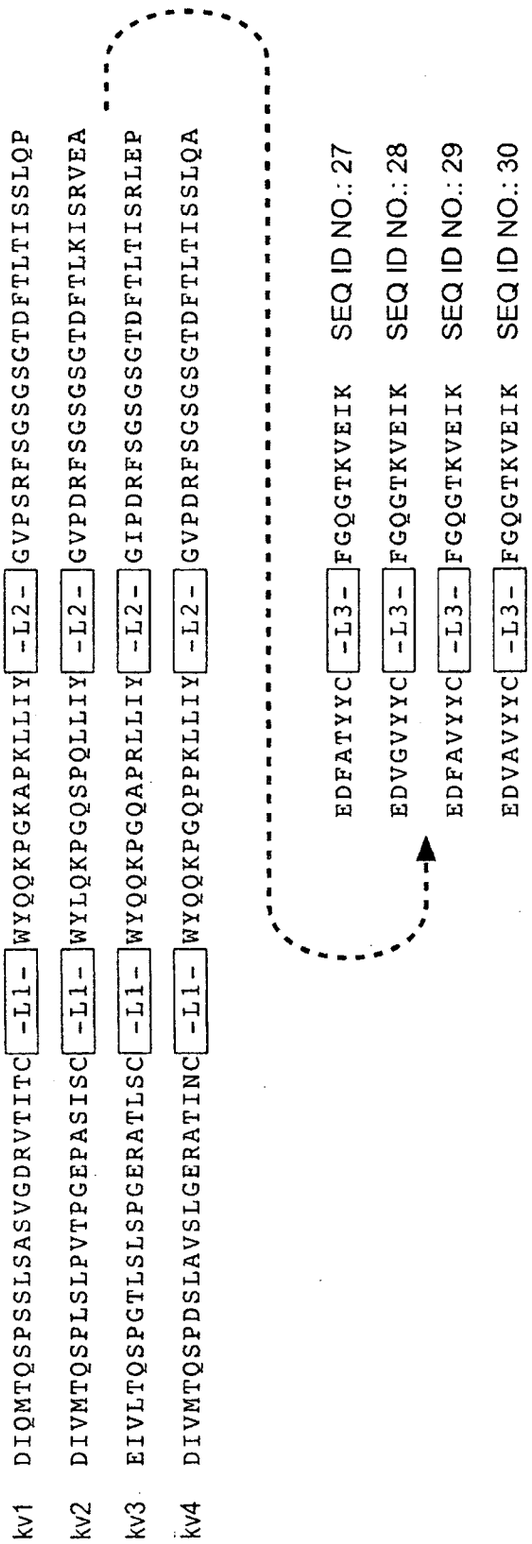

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
kv2 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA
kv3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
kv4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA
EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 27
EDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 28
EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 29
EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 30

FIG. 3

Framework Sequences of huMAb4D5-8 Heavy Chain

HC-FR1 ^{1}Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser^{25} (SEQ ID NO: 31)

HC-FR2 ^{36}Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val^{48} (SEQ ID NO: 32)

HC-FR3 ^{66}Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn^{82a} Ser^{82b} Leu^{82c} Arg^{83} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys^{92} (SEQ ID NO: 33)

HC-FR4 ^{103}Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser^{113} (SEQ ID NO: 34)

Framework Sequences of huMAb4D5-8 Light Chain

LC-FR1 ^{1}Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys^{23} (SEQ ID NO: 35)

LC-FR2 ^{35}Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr^{49} (SEQ ID NO: 36)

LC-FR3 ^{57}Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys^{88} (SEQ ID NO: 37)

LC-FR4 ^{98}Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys^{107} (SEQ ID NO: 38)

FIG. 4

Framework Sequences of huMAb4D5-8 Heavy Chain Modified at Positions 71, 73 and 78 (Underlined)

HC-FR1 ^{1}Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser^{25} (SEQ ID NO: 31)

HC-FR2 ^{36}Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val^{48} (SEQ ID NO: 32)

HC-FR3 ^{66}Arg Phe Thr Ile Ser <u>Arg</u> Asp <u>Asn</u> Ser Lys Asn Thr <u>Leu</u> Tyr Leu Gln Met Asn^{82a} Ser^{82b} Leu^{82c} Arg^{83} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys^{92} (SEQ ID NO: 42)

HC-FR4 ^{103}Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser^{113} (SEQ ID NO: 34)

Framework Sequences of huMAb4D5-8 Light Chain Modified at Position 66 (Underlined)

LC-FR1 ^{1}Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys^{23} (SEQ ID NO: 35)

LC-FR2 ^{35}Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr^{49} (SEQ ID NO: 36)

LC-FR3 ^{57}Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser <u>Gly</u> Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys^{88} (SEQ ID NO: 41)

LC-FR4 ^{98}Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys^{107} (SEQ ID NO: 38)

FIG. 5

Kabat No.	CDR-L1							CDR-L2							CDR-L3									
	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
B20-4.1.1	G	V	R	T	S	L		D	A	S	S	L	A		S	Y	K	S	P	L				
B20-4.1.1RR	A	I	R	R	S	L		D	A	S	S	L	A		S	Y	K	S	P	L				

FIG. 6

Kabat No.	CDR-H1							CDR-H2													CDR-H3												
	28	29	30	31	32	33	34	35	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	94	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	101	102
B20-4.1.1	S	I	S	G	S	W	I	F	G	A	I	W	P	F	G	G	Y	T	H	R	W	G	H	S	T	S	P	W	A	M	D	Y
B20-4.1.1RR	S	I	S	G	S	W	I	F	G	A	I	W	P	F	G	G	Y	T	H	R	W	G	H	S	T	S	P	W	A	M	D	Y

FIG. 7

Anti-VEGF Light Chain

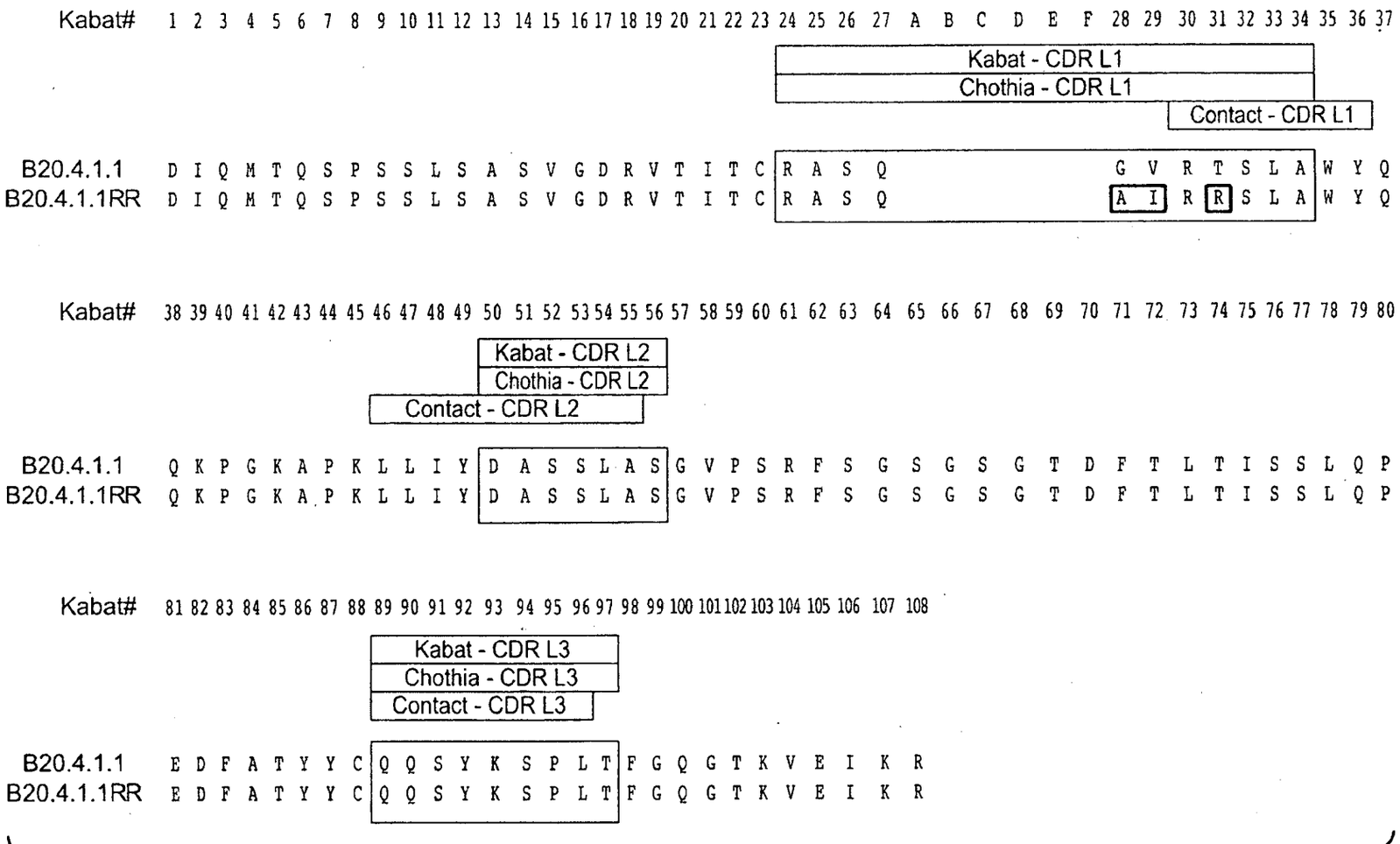


FIG. 8

Anti-VEGF Heavy Chain

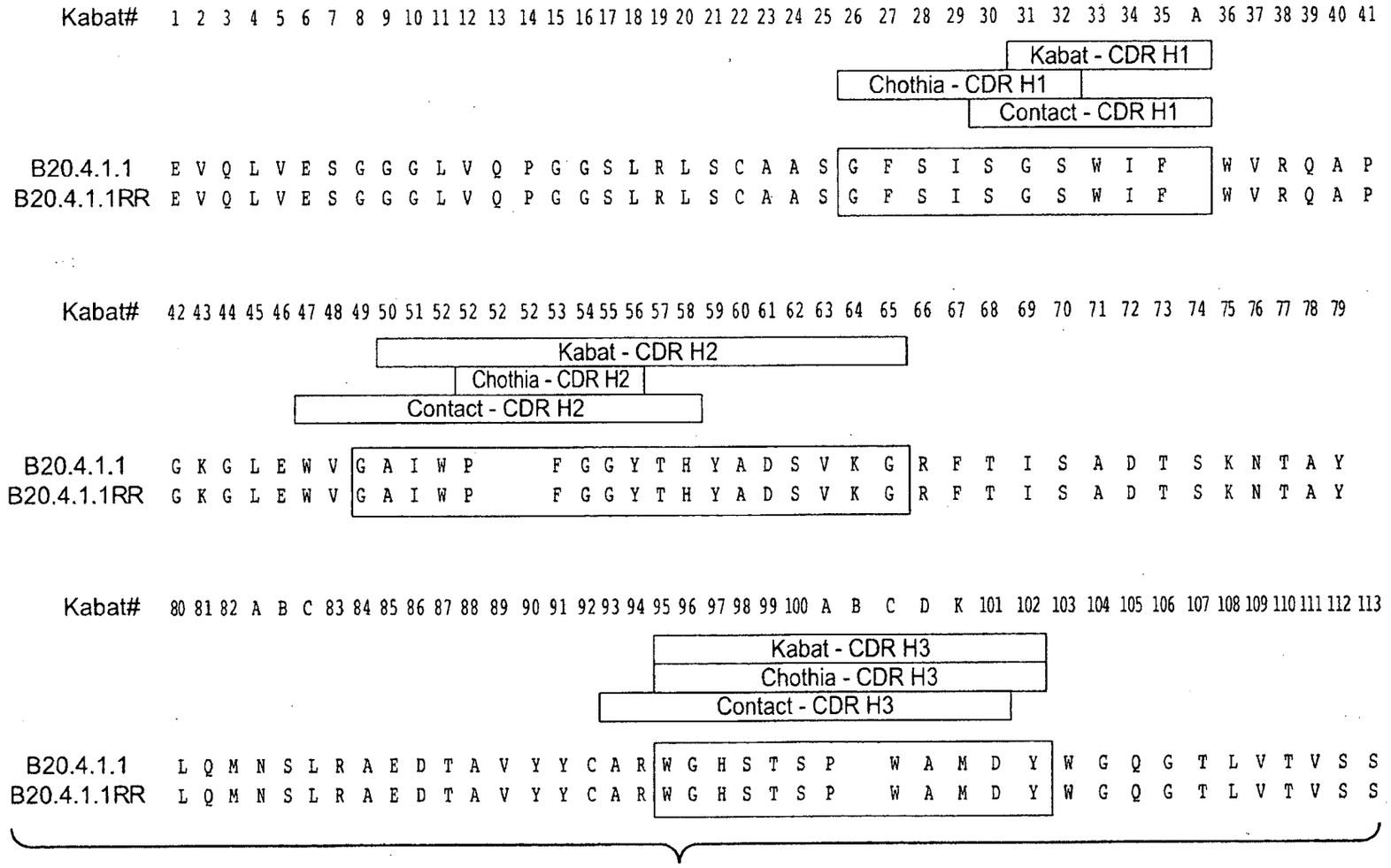


FIG. 9

37C IgG	$k_{on}(x10^4)M^{-1}s^{-1}$		$k_{off}(x10^{-4})s^{-1}$		$Kd(k_{off}/k_{on})nM$	
	hVEGF	mVEGF	hVEGF	mVEGF	**hVEGF**	**mVEGF**
B20.4.1	0.74	0.64	0.002	0.024	**0.02**	**0.37**
B20.4.1.1	7.1	5.59	5.94	5.66	**8.34**	**10.13**
B20.4.1.1RR	19.4	13.9	6.23	7.27	**3.21**	**5.23**

FIG. 10

37C IgG	$k_{on}(x10^4)M^{-1}s^{-1}$		$k_{off}(x10^{-4})s^{-1}$		$Kd(k_{off}/k_{on})nM$	
	hVEGF	mVEGF	hVEGF	mVEGF	**hVEGF**	**mVEGF**
B20.4.1	19.2	31.9	2.23	7.2	**1.16**	**2.26**
B20.4.1.1	57.1	33.1	9.68	7.91	**1.70**	**2.39**
B20.4.1.1RR	65.1	44.6	5.53	6.07	**0.85**	**1.36**

FIG. 11

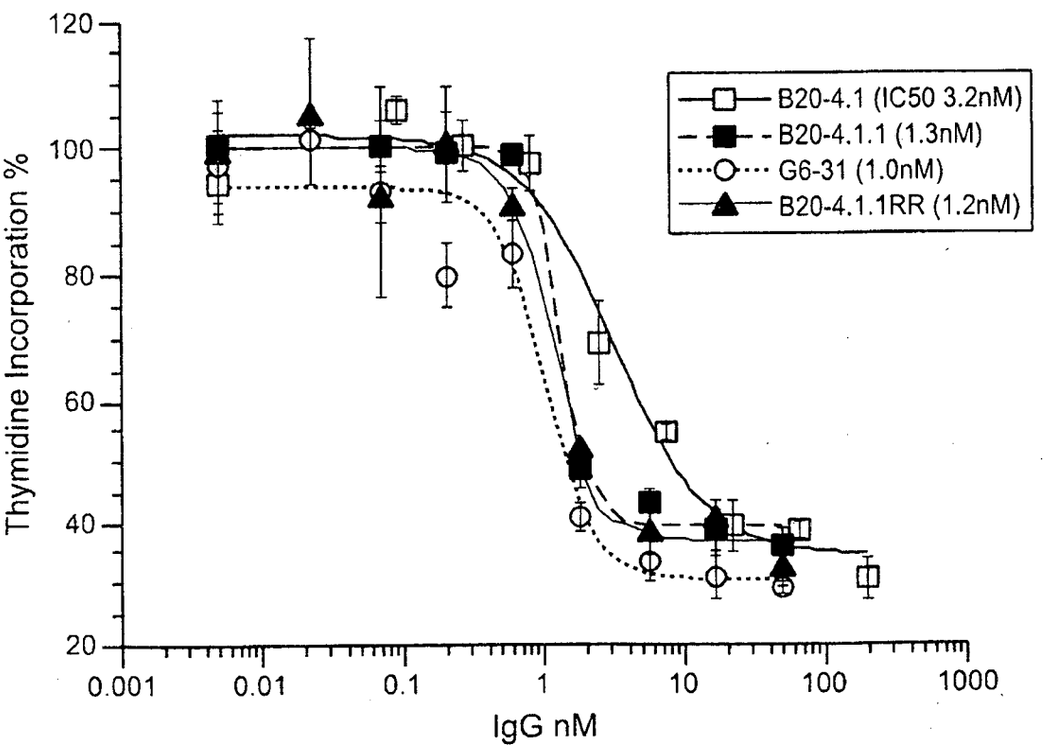


FIG. 12

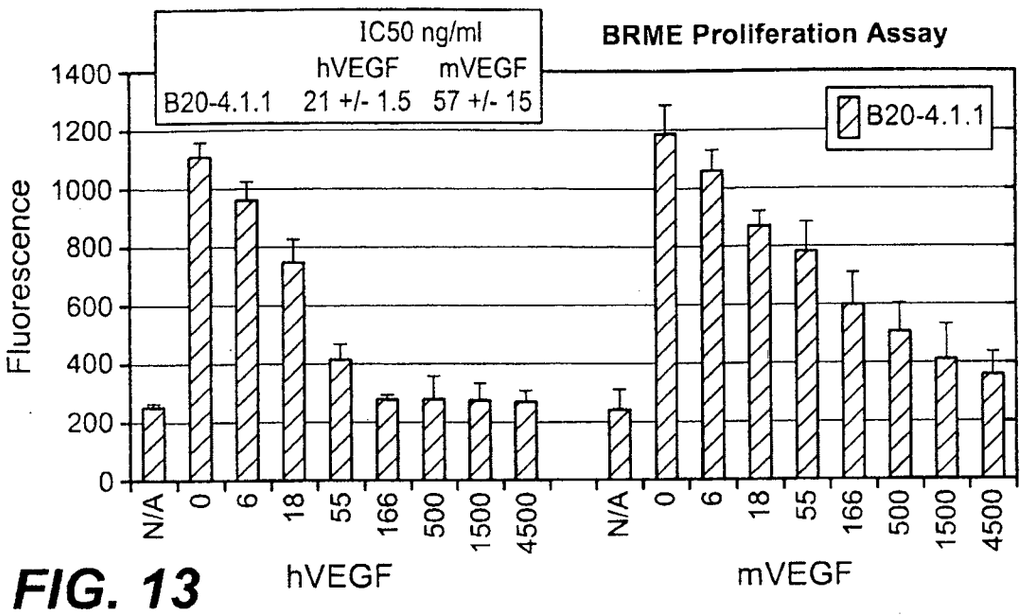

BRME Proliferation Assay
IC50 ng/ml
hVEGF mVEGF
B20-4.1.1 21 +/- 1.5 57 +/- 15
B20-4.1.1
Fluorescence
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
N/A
0
6
18
55
166
500
1500
4500
hVEGF
mVEGF

FIG. 13

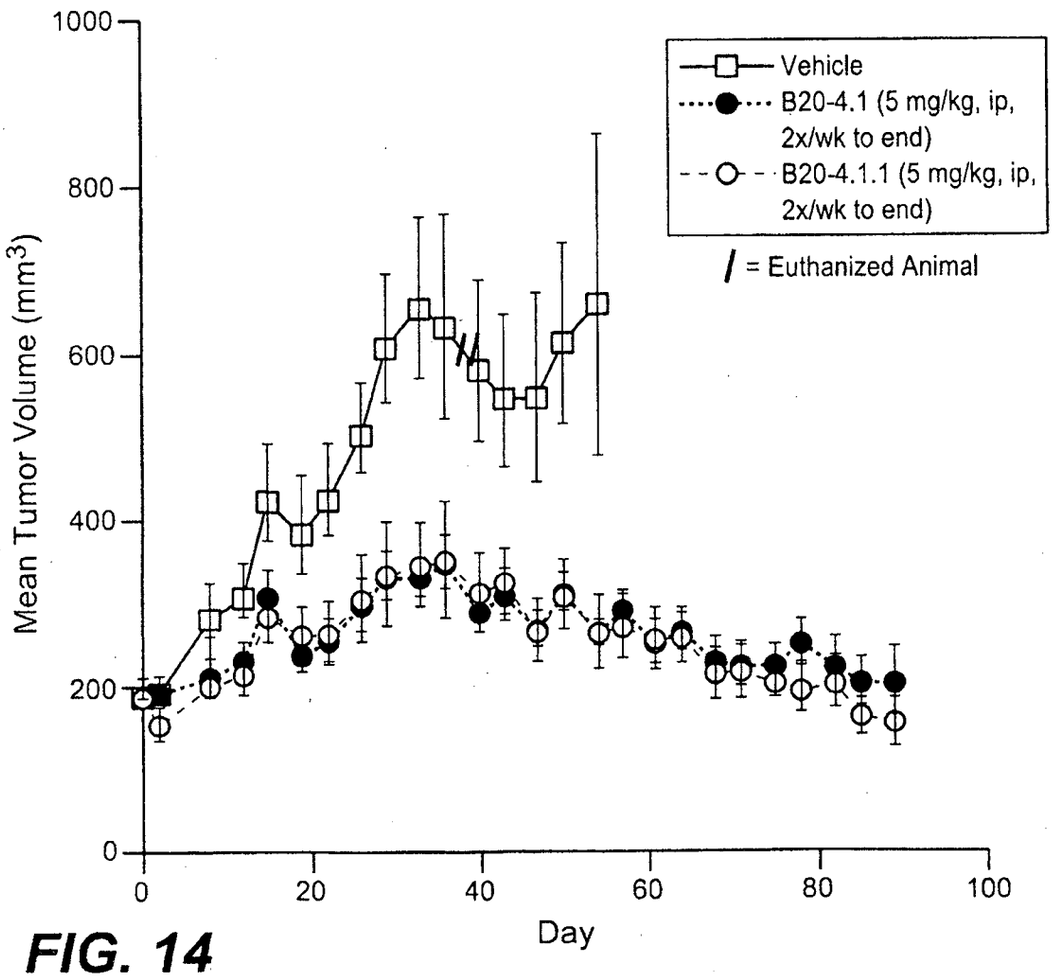

Vehicle
B20-4.1 (5 mg/kg, ip, 2x/wk to end)
B20-4.1.1 (5 mg/kg, ip, 2x/wk to end)
= Euthanized Animal
Mean Tumor Volume (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
80
100
Day

FIG. 14

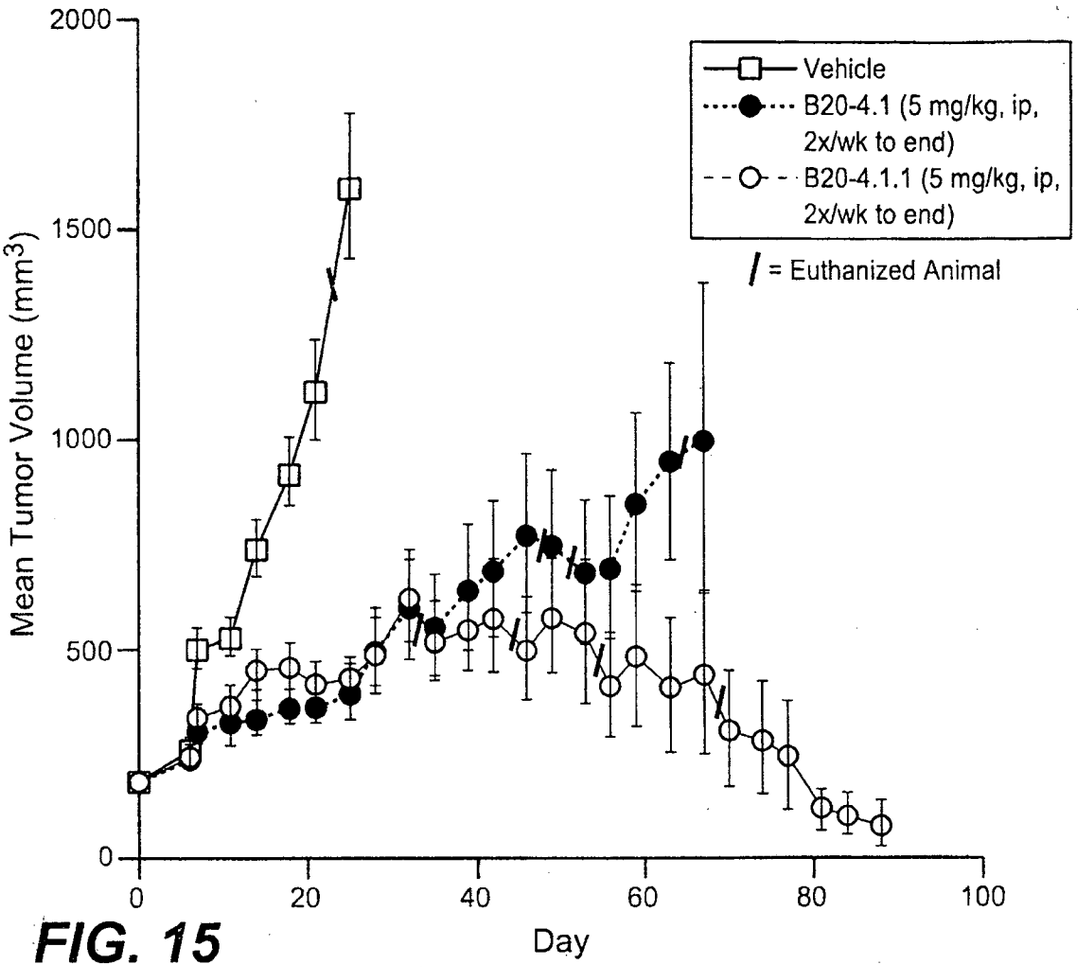

Vehicle
B20-4.1 (5 mg/kg, ip, 2x/wk to end)
B20-4.1.1 (5 mg/kg, ip, 2x/wk to end)
/ = Euthanized Animal
Mean Tumor Volume (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
80
100
Day

FIG. 15

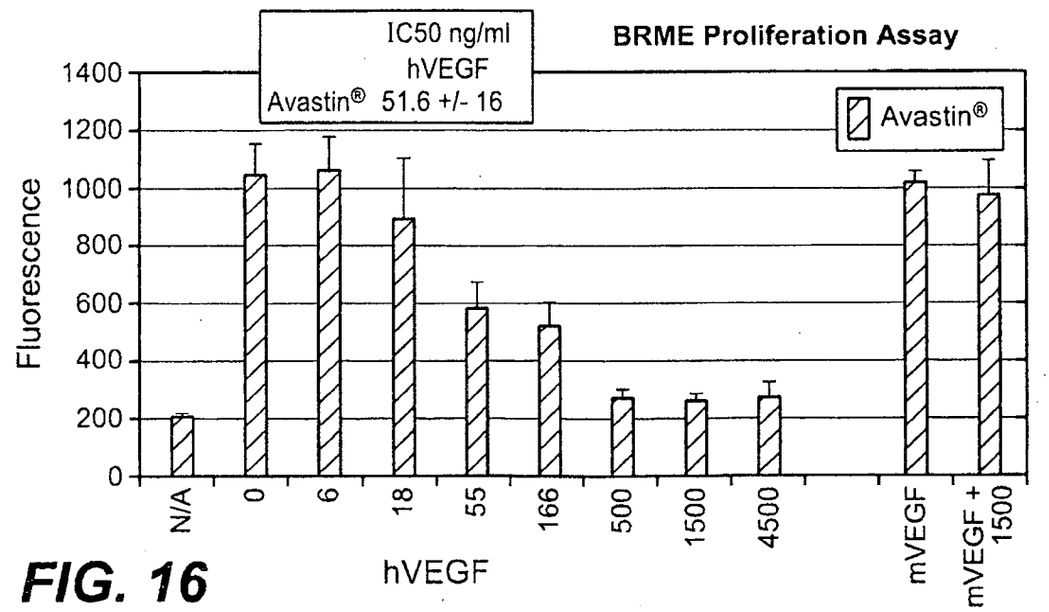

IC50 ng/ml
hVEGF
Avastin® 51.6 +/- 16
BRME Proliferation Assay
Avastin®
Fluorescence
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
N/A
0
6
18
55
166
500
1500
4500
mVEGF
mVEGF + 1500
hVEGF

FIG. 16

Organizacion y
Digitalizacion SAS Ltd

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 10-78672

54. **TÍTULO** 2/2

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE**

DOMICILIO

74. **APODERADO**

22. **BOGOTÁ, D.C.,**

(FORMA P-10)

160

ANTICUERPOS ANTI-VEGF

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] Esta invención se relaciona generalmente con secuencias de polipéptido seleccionadas anti-VEGF y anticuerpos con propiedades benéficas para propósitos de investigación, diagnósticos y terapéuticos.

ANTECEDENTE DE LA INVENCIÓN

[0002] El desarrollo de un sistema vascular es un requerimiento fundamental para muchos procesos patológicos y fisiológicos. Los tejidos que crecen activamente tal como embriones y tumores requieren suministro sanguíneo adecuado. Ellos satisfacen esta necesidad al producir factores pro-angiogénicos, que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos por vía de un proceso llamado angiogenia. La formación de tubo vascular es un evento biológico complejo pero ordenado que involucra todas o muchas de las siguientes etapas: a) Células endoteliales (EC) que proliferan de EC existentes o diferenciadas de células progenitoras; b) las EC migran y se unen para formar estructuras similares a cuerdas; c) las cuerdas vasculares que luego experimentan tubulogenia para formar vasos con un lúmen central; d) existen cuerdas o vasos que envían brotes para formar vasos secundarios; e) el plexo vascular primitivo experimenta remodelamiento y reorganización adicional; y f) células peri-endoteliales se recolectan para almacenar los tubos endoteliales, proporcionando mantenimiento y funciones moduladoras a los vasos; tales células incluyen pericitos para capilares pequeños, células de músculo liso para vasos más grandes, y células miocardiales 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).

[0003] Está bien establecido que la angiogenia se implica en la patogenia de una variedad de trastornos. Estos incluyen tumores sólidos y metástasis, aterosclerosis, fibroplasia retrolental, hemangiomas, inflamación crónica, enfermedades neovasculares intraoculares tal como retinopatías proliferativas, por ejemplo, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), glaucoma neovascular, rechazo inmune de tejido corneal trasplantado y otros tejidos, artritis reumatoide, y soriasis. Folkman et al., J. Biol. Chem., 267:10931-10934 (1992); Klagsbrun et al., Annu. Rev. Physiol. 53:217-239 (1991); y Garner A., "Vascular diseases," In: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710.

[0004] En el caso de crecimiento de tumor, la angiogenia parece ser crucial para la transición de hiperplasia a neoplasia, y para proporcionar nutrición para el crecimiento y metástasis del tumor. Folkman et al, Nature 339:58 (1989). La neovascularización permite a las células de tumor adquirir una ventaja de crecimiento y autonomía proliferativa comparado con células normales. Un tumor usualmente empieza como una célula aberrante única, que puede proliferar solo a un tamaño de unos pocos milímetros cúbicos debido a la distancia de glóbulos capilares disponibles, y este puede permanecer 'latente' sin crecimiento adicional y diseminación durante un largo periodo. Algunas células de tumor cambian al fenotipo angiogénico para activar células endoteliales, que proliferan y maduran en nuevos vasos sanguíneos capilares. Estos vasos sanguíneos nuevamente formados no solo permiten continuar el crecimiento del tumor primario, sino

162

también para la diseminación y recolonización de células de tumor metastásicas. De acuerdo con lo anterior, se ha observado una correlación entre la densidad de microvasos en secciones de tumor y la supervivencia del paciente en cáncer de mama así como también en varios otros tumores. Weidner et al, N. Engl. J. Med 324:1-6 (1991); Horak et al, Lancet 340: 1120-1 124 (1992); Macchiarini et al, Lancet 340:145-146 (1992). Los mecanismos precisos que controlan el cambio angiogénico no se entienden bien, pero se considera que la neovascularización de la masa de tumor resulta del balance solo de una multitud de estimuladores e inhibidores de la angiogenia (Folkman, Nat Med 1(1):27-31 (1995)).

[0005] El proceso de desarrollo vascular es bastante regulado. A la fecha, se ha mostrado un número significativo de moléculas, la mayoría de factores secretados producidos por células circundantes, regulan la diferenciación de EC, proliferación, migración y coalescencia en estructuras similares a cuerda. Por ejemplo, se ha identificado el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como el factor clave involucrado en estimular la angiogenia y en inducir permeabilidad vascular. Ferrara et al, Endocr. Rev. 18:4-25 (1997). El hallazgo que la pérdida de aún un único alelo VEGF resulta en puntos de letalidad embriónica para un papel irreemplazable jugado por este factor en el desarrollo y diferenciación del sistema vascular. Adicionalmente, el VEGF ha mostrado ser un mediador clave de neovascularización asociado con tumores y trastornos intraoculares. Ferrara et al, Endocr. Rev. supra. El mARN VEGF se sobreexpresa por la mayoría de tumores humanos examinados. Berkman et ah, J. Clin. Invest. 91 :153-159 (1993); Brown et ah, Human Pathol. 26:86-91 (1995); Brown et ah, Cáncer Res. 53:4727-4735 (1993); Mattern et ah, Brit. J. Cáncer 73:931-934 (1996); Dvorak et ah, Am. J. Pathol. 146: 1029-1039 (1995).

163

[0006] También, los niveles de concentración del VEGF en los fluidos oculares se correlacionan altamente con la presencia de proliferación activa de vasos sanguíneos en pacientes con retinopatías diabéticas y otras relacionadas con isquemia. Aiello et ah, N. Engl. J. Med. 331: 1480-1487 (1994). Adicionalmente, los estudios han demostrado la ubicación de VEGF en membranas neurovasculares coroidales en pacientes afectados por AMD. Lopez et ah, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:855-868 (1996).

[0007] Los anticuerpos neutralizantes anti-VEGF suprimen el crecimiento de una variedad de estirpes celulares humanas en ratones sin pelo (Kim et ah, Nature 362:841-844 (1993); Warren et ah, J. Clin. Invest. 95:1789-1797 (1995); Borgstrôm et ah, Cáncer Res. 56:4032- 4039 (1996); Melnyk et ah, Cáncer Res. 56:921-924 (1996)) y también inhiben angiogenia intraocular en modelos de trastornos retinales isquémicos. Adamis et ah, Arch. Ophthalmol. 1 14:66-71 (1996). Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales anti-VEGF u otros inhibidores de VEGF son candidatos promisorios para el tratamiento de tumores y varios trastornos neurovasculares intraocular neovasculares. Se describen tales anticuerpos, por ejemplo, en EP 817,648 publicada en Enero 14, 1998; y en WO98/45331 y WO98/45332, ambos publicados en Octubre 15, 1998. Uno de los anticuerpos anti-VEGF, bevacizumab, han sido probados por la FDA para uso en combinación con un régimen de quimioterapia para tratar el cáncer colorectal metastásico (CRC) y cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). Y el bevacizumab se ha investigado en muchos ensayos clínicos en curso para tratar varios indicios de cáncer.

[0008] Son bien conocidos otros anticuerpos anti-VEGF, anticuerpos anti-Nrp1 y anticuerpos anti-Nrp2, y se describen, por ejemplo, en Liang et a , J Mol Biol 366,

164

815-829 (2007) y Liang et ah, J Biol Chem 281 , 951 -961 (2006), Publicación PCT número WO2007/056470 y Solicitud PCT No. PCT/US2007/069179, el contenido de estas solicitudes de patente se incorpora expresamente aquí como referencia.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0009] La invención proporciona anticuerpos anti-VEGF novedosos y sus usos.

[0010] Se proporcionan en la invención un número de anticuerpos anti-VEGF. Por ejemplo, se proporciona un anticuerpo que une a VEGF o un fragmento del mismo, en donde el anticuerpo comprende seis HVR seleccionados de:

(i) un HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácido de $X_1X_2R\ X_3SL$ en donde el HVR-L1 comprende 1, 2 o 3 sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: X_1 es G o A; X_2 es V o I; y/o X_3 es T o R;

(ii) un HVR- L2 que comprende la secuencia de aminoácido de DASSLA (SEQ ID NO:6);

(iii) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SYKSPL (SEQ ID NO:7);

(iv) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SISGSWIF (SEQ ID NO:1);

(v) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de G AIWPFGG YTH (SEQ ID NO:2).; y

165

(vi) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de RWGHSTSPWAMDY (SEQ ID NO:3).

[0011] En otra realización, se proporciona un anticuerpo que une a VEGF o un fragmento del mismo, en donde el anticuerpo comprende:

(i) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1;

(2) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:2;

(3) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:3

(4) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:4;

(5) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:6; y

(6) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:7.

[0012] En otra realización, se proporciona un anticuerpo que une a VEGF o un fragmento del mismo, en donde el anticuerpo comprende:

(i) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:1;

(2) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:2;

(3) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:3

166.

(4) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:5;

(5) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:6; y

(6) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:7.

[0013] En otra realización, se proporciona un anticuerpo que une a VEGF o un fragmento del mismo, en donde el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44 o SEQ ID NO:45.

[0014] En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une a VEGF o un fragmento del mismo, en donde el anticuerpo anti-VEGF comprende el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44 o 45. En todavía otra realización, el anticuerpo anti-VEGF comprende el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44. En todavía otra realización, el anticuerpo anti-VEGF comprende el dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:45.

[0015] En ciertas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anteriores es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o $(Fab')_2$. En

167

una realización, el anticuerpo es humanizado. En una realización, el anticuerpo es humano. En todavía otra realización, por lo menos una porción de la secuencia de estructura es una secuencia de estructura consensus humana.

[0016] Se proporcionan los polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos anteriores, así como también vectores que comprenden los polinucleótidos y células anfitrionas que comprenden los vectores de la invención. En una realización, la célula anfitriona es eucariótica. En otra realización, la célula anfitriona es una célula CHO. También se proporciona un método para elaborar un anticuerpo anti-VEGF. Por ejemplo, un método comprende cultivar la célula anfitriona bajo condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo, e aislar el anticuerpo.

[0017] En un aspecto, se proporciona un método para detectar la presencia de VEGF en una muestra biológica, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo de la invención bajo condiciones permisivas para la unión del anticuerpo a VEGF, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y VEGF. En una realización, el método comprende detectar el complejo de anticuerpo VEGF-anti-VEGF en una muestra biológica en donde la secuencia de aminoácido del anticuerpo anti-VEGF comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44 o 45. En todavía otra realización, el método comprende detectar el complejo de anticuerpo VEGF-anti-VEGF en una muestra biológica en donde la secuencia de aminoácido del anticuerpo anti-VEGF comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de

aminoácido de SEQ ID NO:44. En todavía otra realización, el método comprende detectar el complejo de anticuerpo VEGF-anti-VEGF en una muestra biológica en donde la secuencia de aminoácido del anticuerpo anti-VEGF comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:45. En todavía otra realización, el anticuerpo anti-VEGF se marca detectablemente.

[0018] También se proporcionan composiciones farmacéuticas así como también métodos de tratamiento. En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, se proporciona un método para tratar el cáncer, por ejemplo, el método comprende administrar a un individuo la composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos anteriores. Los cánceres tratados por los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, cáncer de célula epidermoide, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma epidermoide del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer estromal gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer renal o de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroide, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, melanoma, melanoma de esparcido superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginoso acral, melanomas nodulares, linfoma de célula B, leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de célula capilar;

leucemia de mieloblastos crónica; trastorno linfoproliferativo post-transplante (PTLD), proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema asociado con tumores de cerebro, o Síndrome de Meigs. En ciertas realizaciones, el tumor, cáncer o trastorno proliferativo de célula que se trata es cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama o glioblastoma. En todavía otra realización, el sujeto que se trata es humano.

[0019] La invención proporciona adicionalmente inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente, tal como un fármaco o agente citotóxico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0020] Figura 1: Las secuencias de bucle HVR de cadena pesada y cadena liviana de anticuerpos anti-VEGF. Las figuras muestran las secuencias HVR de cadena pesada, H1, H2, y H3, y las secuencias HVR de cadena liviana, L1, L2, y L3. El número de secuencia es como sigue: clon B20-4.1.1 (HVR-H1 es SEQ ID NO: 1; HVR-H2 es SEQ ID NO:2; HVR-H3 es SEQ ID NO:3; HVR-L1 es SEQ ID NO:4; HVR-L2 es SEQ ID NO:6; HVR-L3 es SEQ ID NO:7); y clon B20-4.1.1RR (HVR-H1 es SEQ ID NO: 1 ; HVR-H2 es SEQ ID NO:2; HVR-H3 es SEQ ID NO:3; HVR-L1 es SEQ ID NO:5; HVR-L2 es SEQ ID NO:6; HVR-L3 es SEQ ID NO:7).

[0021] Las posiciones de aminoácido se enumeran de acuerdo con el sistema de numeración Kabat como se describe adelante.

170

[0022] Figuras 2a y 2b: se describe la secuencia de estructura consensus humana receptora de ejemplo para uso en practicar la actual invención con identificadores de secuencia como sigue:

Estructuras consensus (VH) pesadas variables

Estructura consensus subgrupo I VH humano menos CDR Kabat (SEQ ID NO:8)

estructura consensus subgrupo I VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs:9-11)

estructura consensus subgrupo II VH humana menos CDR Kabat (SEQ ID NO:12)

estructura consensus subgrupo II VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 13- 15)

estructura consensus subgrupo II VH humana menos estructura consensus subgrupo III VH humana extendida menos CDR Kabat (SEQ ID NO: 16)

estructura consensus subgrupo III VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs: 17-19)

estructura receptora VH humana menos CDR Kabat (SEQ ID NO:20) estructura receptora VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs:21-22)

estructura 2 receptora VH humana menos CDR Kabat (SEQ ID NO:23) estructura 2 receptora VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NOs:24-26)

[0023] Las posiciones de aminoácido se enumeran de acuerdo con el sistema de numeración Kabat como se describe adelante.

171

[0024] Figura 3: describe secuencias de estructura consensus humanas receptoras de ejemplo para uso en practicar la actual invención con identificadores de secuencia como sigue:

Estructuras consensus (VL) livianas variables

estructura consensus subgrupo I kappa VL humana (SEQ ID NO:27) estructura consensus subgrupo II kappa VL humana (SEQ ID NO:28) estructura consensus subgrupo III kappa VL humana (SEQ ID NO:29) estructura consensus subgrupo IV kappa VL humana (SEQ ID NO:30)

[0025] Figura 4: describe secuencias de región de estructura de las cadenas liviana y pesada huMAb4D5-8. Los Números en superíndice/negrilla indican las posiciones de aminoácido de acuerdo con Kabat.

[0026] Figura 5: describe secuencias de región de estructura modificada/variante de cadenas pesada y liviana huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrilla indican las posiciones de aminoácido de acuerdo con Kabat.

[0027] Figura 6: La secuencia de aminoácidos de las secuencias HVR de cadena liviana L1, L2 y L3 para anticuerpos anti-VEGF B20-4.1.1 y B20-4.1.1RR.

[0028] Figura 7: La secuencia de aminoácidos de las secuencias HVR de cadena pesada H1, H2, y H3 para anticuerpos anti-VEGF B20-4.1.1 y B20-4.1.1RR.

[0029] Figura 8: describe las regiones variables de cadena liviana de clones de anticuerpo B20-4.1.1 (SEQ ID NO:44) y B20-4.1.1 RR (SEQ ID NO:45).

172

[0030] Figura 9: describe las regiones variables de cadena pesada de clones de anticuerpo B20-4.1.1 y B20-4.1.1RR (SEQ ID NO:43).

[0031] Figura 10: La Tabla resume la medición de afinidad de unión cinética de las variantes IgG B20 a VEGF humano y VEGF murino. El VEGF humano o murino se inmoviliza para alcanzar aproximadamente 60 unidades de respuesta.

[0032] Figura 11: La Tabla resume la medición de afinidad de unión cinética de los IgG variantes B20 con VEGF humano y VEGF murino. El VEGF humano o murino se inmoviliza para alcanzar aproximadamente 1000 unidades de respuesta.

[0033] Figura 12: Ensayo de incorporación de timidina HUVEC, que muestra que las variantes B20 pueden inhibir efectivamente la proliferación celular HUVEC.

[0034] Figura 13: describe el efecto de B20-4.1.1 en la proliferación BRME inducida por VEGF.

[0035] Figura 14: describe el efecto de B20-4.1.1 en el crecimiento de tumor en ratones desnudos con células de tumor humanas de xenoinjerto (células A549), según se mide mediante volúmenes de tumor sobre el número de días de tratamiento.

[0036] Figura 15: describe el efecto de B20-4.1.1 en el crecimiento de tumor en ratones desnudos con células de tumor humanas de xenoinjerto (células MDA-MB231), según se mide mediante volúmenes de tumor sobre el número de días de tratamiento.

173

[0037] Figura 16: describe el efecto del anticuerpo avastina en la proliferación BRME inducida por VEGF. La inhibición de mVEGF no se observa en una concentración de hasta 1500 nM del anticuerpo avastina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0038] La invención aquí proporciona anticuerpos aislados que unen a VEGF y sus usos. También se proporcionan composiciones farmacéuticas así como también métodos de tratamiento.

[0039] La invención proporciona adicionalmente métodos para elaborar anticuerpos anti-VEGF, y polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-VEGF.

Técnicas Generales

[0040] Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados aquí se entienden bien generalmente y se emplean comúnmente utilizando la metodología convencional por aquellos expertos en la técnica, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) ANTICUERPOS, A LABORATORY MANUAL, AND ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984);

174

Métodos in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley y Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley y Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles y Practice of Oncology (V. T. DeVita et al, eds., J. B. Lippincott Company, 1993).

Definiciones

[0041] Para propósitos de interpretar esta especificación, se aplicarán las siguientes definiciones y, según sea apropiado, los términos utilizados en singular también incluirán el plural y viceversa. En el evento que cualquier definición establecida adelante entre en conflicto con cualquier documento incorporado aquí como referencia, la definición establecida adelante debe controlar.

[0042] El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos {por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo mientras ellos exhiben la actividad biológica deseada.

[0043] El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de ocurrencia natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. Así, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, tal un anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido que une un objetivo, en donde la secuencia de polipéptido que une el objetivo se obtienen mediante un proceso que incluye la selección de una secuencia de polipéptido que une al objetivo única de una pluralidad de secuencias de polipéptido. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tal como un grupo de clones de hibridoma, clones fago, o clones de ADN recombinante. Se debe entender que una secuencia de unión objetivo seleccionada se puede alterar adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad para el objetivo, para humanizar la secuencia de unión objetivo, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad in vivo, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión objetivo alterada también es un anticuerpo monoclonal de esta invención. En contraste a las preparaciones de anticuerpo policlonal, que incluyen típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos

contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en un antígeno. En adición a su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal son ventajosas en que ellas no se contaminan típicamente por otras inmunoglobulinas.

[0044] El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo cuando se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se construye como la producción requerida del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser utilizados de acuerdo con la presente invención se pueden hacer mediante una variedad de técnicas, que incluye, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature, 256:495-97 (1975); Hongo et al, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al, in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,816,567), tecnologías de exhibición de fago (ver, por ejemplo, Clackson et al, Nature, 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol 222: 581-597 (1992); Sidhu et al, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. ScL USA 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., J. Immunol. Métodos 284(1-2): 1 19-132(2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes o todos de los locus de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al, Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al, Year in Immunol. 7:33 (1993); U.S.

177

Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016; Marks et al, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al, Nature Biotechnol 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

[0045] Los anticuerpos monoclonales aquí incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena liviana y/o pesada es idéntica con o homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras el resto de la cadena o cadenas es idéntico con o homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a clases o subclases de anticuerpos, así como también fragmentos de tales anticuerpos, mientras ellos exhiben la actividad biológica deseada (ver, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,816,567; y Morrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en donde la región de unión de antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido por, por ejemplo, monos macaco inmunizantes con el antígeno de interés.

[0046] "Humanizado" formas de anticuerpos no humanos {por ejemplo, murino) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en el que los residuos de un HVR del receptor se reemplazan por residuos de un HVR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo, o primate no humano que tiene la especificidad deseada, afinidad, y/o capacidad. En algunos casos, los

178

residuos FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o donar en el anticuerpo donante. Se pueden hacer estas modificaciones para refinar adicionalmente desarrollo de anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todo o sustancialmente todo de los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana, y todo o sustancialmente todos de los FR son aquellos de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, ver, por ejemplo, Jones et al, Nature 321 :522-525 (1986); Riechmann et al, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Ver también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-I 15 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); y Patente Estadounidense Nos. 6,982,321 y 7,087,409.

[0047] Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácido que corresponde a aquel de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha hecho utilizando cualquiera de las técnicas para elaborar anticuerpos humanos como se describe aquí. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Se pueden producir anticuerpos humanos utilizando varias técnicas conocidas en el arte, que incluyen colecciones de exhibición de fago. Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol,

222:581 (1991). También disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos son métodos descritos en Cole et al, Monoclonal Antibodies and Cáncer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al, J. Immunol, 147(l):86-95 (1991). Ver también van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol, 5: 368-74 (2001). Se pueden preparar anticuerpos humanos al administrar el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir tales anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyo locus endógeno se han deshabilitado, por ejemplo, xenoratones inmunizados (ver, por ejemplo, Patente Estadounidense Nos. 6,075, 181 y 6, 150,584 con respecto a tecnología XENOMOUSE™). Ver también, por ejemplo, Li et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) con respecto a los anticuerpos humanos generados por vía de una tecnología de hibridoma de célula B humana.

[0048] Un "anticuerpo dependiente de especie" es uno que tiene una afinidad de unión más fuerte para un antígeno de una primera especie de mamífero que tiene para un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie "une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene una afinidad de unión (K_d) 7 o valor de no más de aproximadamente 1 x 10^{-7} M, preferiblemente no más de aproximadamente 1 x 10^{-8} M y más preferiblemente no más de aproximadamente 1 x 10^{-9} M), pero tiene una afinidad de unión para un homólogo del antígeno que esconde una segunda especie de mamífero no humana que es por lo menos aproximadamente 50 veces, o por lo menos aproximadamente 500 veces, o por lo menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión para el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los varios tipos de anticuerpos como se definió anteriormente, pero preferiblemente es un anticuerpo humano o humanizado.

L80

[0049] Como se utiliza aquí, "mutante de anticuerpo" o "variante de anticuerpo" se refiere a una variante de secuencia de aminoácido del anticuerpo que depende de la especie en donde se ha modificado uno o más de los residuos de aminoácido del anticuerpo que depende de la especie. Tales mutantes necesariamente tienen menos de 100% de identidad de secuencia o similar con el anticuerpo dependiente de especie. En una realización, el mutante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácido que tiene por lo menos 75% de identidad de secuencia de aminoácido o similar con la secuencia de aminoácido del dominio variable de cadena liviana o pesada del anticuerpo que depende de especie, en otra realización por lo menos 80%, en otra realización por lo menos 85%, en otra realización por lo menos 90%, y todavía en otra realización por lo menos 95%. La identidad o similitud con respecto a su secuencia se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, mismo residuo) o similar (es decir, residuo de aminoácido del mismo grupo con base en propiedades de cadena lateral común, ver adelante) con los residuos de anticuerpo dependiente de especie, después alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para alcanzar la identidad de secuencia de porcentaje máximo. Ninguna de las extensiones de terminal N, terminal C, o extensiones internas, eliminaciones, o inserciones en la secuencia de anticuerpo fuera del dominio variable construirse debe construir cuando se afecta la identidad de secuencia o similar.

[0050] Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con la investigación, usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir

enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica (1) a más de 95% en peso del anticuerpo según se determina por, por ejemplo, el método Lowry, y en algunas realizaciones, en más de 99% en peso; (2) botaina un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de terminal N o secuencia de aminoácido interno mediante el uso de, por ejemplo, un secuenciador de copa de giro, o (3) para homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones de reducción o no reducción utilizando, por ejemplo, teñido plata o azul Coomassie. Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes debido a por lo menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. De manera ordinaria, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0051] "anticuerpos nativos" son usualmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150,000 daltons, compuestas de dos cadenas livianas idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena liviana se une a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre la cadena pesada de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y liviana también tiene puentes disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada atiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena liviana tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena liviana se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena liviana se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Los residuos de aminoácido particulares se consideran para formar una interface entre los dominios variables de cadena pesada y de cadena liviana.

[0052] La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios de terminal amino de la cadena pesada y liviana del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede referir como "VH." El dominio variable de la cadena liviana se puede denominar como "VL." Estos dominios son generalmente la mayoría de partes variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

[0053] El término "variable" se refiere al hecho que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensivamente en secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de anticuerpos. Esto se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables (HVR) ambos en los dominios variables de cadena liviana y de cadena pesada. Las porciones más altamente concentradas de dominios variables se llaman las regiones de estructura (FR). Los dominios variables de las cadenas liviana y pesada nativa cada una comprenden cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina beta, conectada por tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Los HVR en cada cadena se mantienen juntos en proximidad cercada mediante las regiones FR y, con los HVR de la otra cadena, contribuye a la formación del sitio de unión de antígeno de anticuerpos (ver Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no se involucran directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tal como la participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

[0054] Las "cadenas livianas" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquiera de las especies de vertebrados se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (K) y lambda (λ), con base en las secuencias de aminoácido de sus dominios constantes.

[0055] Dependiendo de las secuencias de aminoácido de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, se pueden asignar anticuerpos (inmunoglobulinas) a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgAi, y IgA_2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente. Las estructuras de subunidad y tres configuraciones dimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas bien conocidas y descritas generalmente en, por ejemplo, Abbas et al, Cellular y Mol. Immunology, 4th ed. (W. B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

[0056] Los términos "anticuerpo de longitud completa," "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se utilizan intercambiablemente aquí para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, sin fragmentos de anticuerpo como se define adelante. Los términos se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

184

[0057] Un "anticuerpo desnudo" para los propósitos aquí es un anticuerpo que no se conjuga con un grupo funcional citotóxico o radiomarcado.

[0058] "Fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente que comprende la región de unión a antígeno de este. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo.

[0059] La digestión de Papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión de antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento de pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y es todavía capaz de reticular el antígeno.

[0060] "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En una realización, una especie Fv de dos cadenas de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena liviana en asociación estrecha no covalente. En una especie de cadena única Fv (scFv), un dominio variable de cadena liviana y un dominio variable de cadena pesada se puede unir covalentemente a un ligador péptido flexible de tal manera que las cadenas liviana y pesada se puede asociar en una estructura "dimérica" análoga a aquella en especies Fv de dos cadenas. Esto es en esta configuración que los tres HVR de cada dominio variable interactúa para definir un sitio de unió a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, los seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aún un

185

dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir el antígeno, aunque en una baja afinidad que el sitio de unión completo.

[0061] El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena liviana y pesada y también contiene el dominio constante de la cadena liviana y el primer dominio constante (CHI) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de fragmentos Fab mediante la adición de unos pocos residuos en el terminal carboxi del dominio CHI de cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. El Fab' -SH es la designación aquí para Fab' en la que los residuos cisteína de los dominios constantes lleva un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se producen originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisternas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

[0062] Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" comprenden anticuerpo los dominios VH y VL de anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido único. Generalmente, el polipéptido scFv comprende adicionalmente un ligador de polipéptido entre los dominios VH y VL que permite el scFv para formar la estructura deseada para la unión de antígeno. Para una revisión de scFv, ver, por ejemplo, Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

[0063] El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) en la

misma cadena de polipéptido (VH-VL). Al utilizar un ligador que es muy pequeño para permitir formar pares entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a formar pares con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al. , Nat. Med. 9: 129- 134 (2003); y Hollinger et al. , Proc. Natl. Acad. ScL USA 90: 6444-6448 (1993). Los trianticuerpor o tetraanticuerpos también se describen en Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

[0064] El término "región hipervariable," "HVR," o "HV," cuando se utiliza aquí se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en los VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, el H3 y L3 exhiben la mayor diversidad de los seis HVR, y H3 en particular se considera que juega un único papel en conferir especificidad fina para los anticuerpos. Ver, por ejemplo, Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, in Methods in Molecular Biology 248: 1 -25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos camelid de ocurrencia natural que consisten de una cadena pesada solo son funcionales y estables en la ausencia de la cadena liviana. Ver, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993); Sheriff et al, Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996).

[0065] Un número de delimitaciones HVR están en uso y se abarcan aquí. Las Regiones Determinantes de Complementariedad Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencia y se utilizan más comúnmente (Kabat et al., Sequences

of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). La Chothia se refiere en su lugar a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los HVR AbM representan un compromiso entre los HVR Kabat y bucles estructurales Chothia, y se utilizan mediante software de modelamiento de anticuerpo AbM de Oxford Molecular. Los HVR "contacto" están con base en análisis de las estructuras de cristal de complejo disponible. Los residuos de cada uno de estos HVR se anotan adelante.

Bucle	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 (Numeración Kabat)	H31 -H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1 (Numeración Chothia)	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47 -H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0066] Los HVR pueden comprender "HVR extendidos" como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en el VL y 26-35 (HI), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en el VH. Los residuos de dominio variable se enumeran de acuerdo con Kabat et al, supra, para cada una de estas definiciones.

188

[0067] "Estructura" o residuos "FR" son aquellos residuos de dominio variable diferentes a los residuos HVR como se define aquí.

[0068] El término "residuo de dominio variable numerado como en Kabat" o "posición de aminoácido numerado como en Kabat," y variaciones de estos, se refiere al sistema de numeración utilizado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena liviana de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., supra. Utilizando este sistema de numeración, la actual secuencia de aminoácido lineal puede contener pocos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento, o inserción en, un FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de aminoácido único (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después el residuo 52 de H2 y residuos insertados {por ejemplo, residuos 82a, 82b, y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después el residuo 82 de cadena pesada FR. La numeración Kabat de los residuos se puede determinar por un anticuerpo dado para alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia de numeración Kabat "estándar".

[0069] El sistema de numeración Kabat se utiliza generalmente cuando se refiere a un residuo en el dominio variable (aproximadamente 1-107 residuos de la cadena liviana y 1-113 residuos de la cadena pesada) (por ejemplo Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se utiliza generalmente cuando se refiere a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU reportado en Kabat et al, supra). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la

numeración de residuo del anticuerpo EU IgG1 humano. A menos que se indique aquí, las referencias para los números de residuo en el dominio variable de anticuerpos significa numeración de residuo por el sistema de numeración Kabat. A menos que se indique otra cosa aquí, las referencias para los números de residuo en el dominio constante de anticuerpos significa numeración de residuo mediante el sistema de numeración EU (por ejemplo, ver Solicitud Provisional estadounidense No. 60/640,323, Figuras para numeración EU).

[0070] Un anticuerpo "afinidad madura" es uno con una o más alteraciones en uno o más HVR de los mismos que resulta en una mejora en la afinidad del anticuerpo para antígeno, comparado con un anticuerpo padre que no posee aquellas alteraciones. En una realización, un anticuerpo de afinidad madura tiene afinidades nanomolares o aún picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos de afinidad madura se pueden producir utilizando ciertos procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks et al. , Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración de afinidad por mezcla de dominio VH y VL. La mutagenia aleatorizada de HVR y/o residuos de estructura se describe mediante, por ejemplo, Barbas et al. , Proc Nat. Acad. ScL USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al, Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. , J. Immunol. 155:1994- 2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

[0071] Un anticuerpo "bloqueado" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Ciertos anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno.

190

[0072] Un " anticuerpo agonista," como se utiliza aquí, es un anticuerpo que imita parcialmente o completamente por lo menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

[0073] Los anticuerpos "inhibidores de crecimiento" son aquellos que evitan o reducen la proliferación de una célula que expresa un antígeno al que se une el anticuerpo.

[0074] El anticuerpo "funciones efectoras" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácido) de un anticuerpo, y varía con el isotipo de anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión C1q y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión del receptor Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; subregulación de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de célula B); y activación de célula B.

[0075] El término "región Fc" aquí se utiliza para definir una región de terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye las regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina puede variar, la región Fc de cadena pesada IgG humana se define usualmente para alargar un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o de Pro230, al terminal carboxilo del mismo. La lisina de terminal C (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede remover, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o al construir por ingeniería recombinantemente el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. De acuerdo con lo anterior, una

composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpo con todos los residuos K447 removidos, las poblaciones de anticuerpo sin residuos K447 removidos, y las poblaciones de anticuerpo que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

[0076] Una "región funcional Fc" posee una "función efectora" de una región fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" de ejemplo incluyen unión Clq; CDC; unión del receptor Fc; ADCC; fagocitosis; subregulación de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de célula B; BCR), etc. Tales funciones efectoras requieren generalmente la región Fc a ser combinada con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se puede evaluar utilizando varios ensayos como se describe, por ejemplo, en las definiciones aquí.

[0077] Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácido idéntica a la secuencia de aminoácido de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos A y no A); región Fc IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc IgG4 humana de secuencia nativa, así como también sus variantes de ocurrencia natural.

[0078] Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácido que difiere de aquel de una región Fc de secuencia nativa por virtud de por lo menos una modificación de aminoácido, preferiblemente una o más sustituciones de aminoácido. Preferiblemente, la región Fc variante tiene por lo menos una sustitución de aminoácido comparado con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido padre, por ejemplo, de aproximadamente uno a

192

aproximadamente diez sustituciones de aminoácido, y preferiblemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácido en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido padre. La región Fc variante aquí poseerá preferiblemente por lo menos aproximadamente 80% de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido padre, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90% de homología de la misma, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 95% de homología de la misma.

[0079] "Receptor Fc " o "FcR" describe un receptor que une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es uno que un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y alternativamente formas divididas de aquellos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activante") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tiene secuencias de aminoácido similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El FcγRIIA de receptor activante contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El FcγRIIB de receptor inhibidor contiene un motivo de inhibición con base en tirosina inmunoreceptora (ITIM) en su dominio citoplásmico. (Ver, por ejemplo, Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas et al, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)). Otros FcR, que incluyen aquellos que son idénticos en el futuro, se abarcan por el término "FcR" aquí.

193

[0080] El término "receptor Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable para la transferencia de IgG maternales a los fetos (Guyer et al, J. Immunol. 1 17:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) y la regulación de homeostasis de inmunoglobulinas. Se conocen métodos para medir la unión a FcRn (ver, por ejemplo, Ghetie y Ward, Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al, Nature Biotechnology, 15(7):637-640 (1997); Hinton et al, J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al).

[0081] La unión al FcRn in vivo y la vida útil del suero de polipéptidos de unión de alta afinidad FcRn humanos se puede medir, por ejemplo, en ratones transgénicos o estirpes celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que los polipéptidos con una región Fc variante se administran. La WO 2000/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con mejora o disminución a la unión de FcR. Ver también, por ejemplo, Shields et al, J. Biol Chem. 9(2):6591-6604 (2001).

[0082] Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y desarrollan funciones efectoras. En ciertas realizaciones, las células expresan por lo menos FcγRIII y desarrollan funciones efectoras ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas, y neutrófilos. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

[0083] La "citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que el Ig secretado se une a los receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células

194

NK, neutrófilos, y macrófagos) que permite a estas células efectoras citotóxicas para unir específicamente a una célula objetivo que lleva antígeno y posteriormente mata la célula objetivo con citotoxinas. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresa FcγRIII solamente, aunque los monolitos expresan FcγRI, FcγRII, y FcγRIII. La expresión FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede desarrollar un ensayo in vitro ADCC, tal como aquel descrito en la Patente estadounidense No. 5,500,362 o 5,821,337 o Patente Estadounidense No. 6,737,056 (Presta). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células PBMC y NK. Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como aquel descrito en Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

[0084] La "Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula objetivo en la presencia de complemento. La activación de la ruta de complemento clásico se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (Clq) a anticuerpos (de la subclase apropiada), que se unen tierra su antígeno cognato. Para evaluar la activación de complemento, se puede desarrollar un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996). Las variantes de polipéptido con secuencias de aminoácido de región Fc alterada (polipéptidos con una región variante Fc) y se describen la capacidad de unión C1q incrementada o reducida, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 6,194,551 B1 y WO 1999/51642. Ver también, por ejemplo, Idusogie et al, J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

192

[0085] El término "anticuerpo que comprende la región Fc" se refiere a un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina de terminal C (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede remover, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. De acuerdo con lo anterior, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc de acuerdo con esta invención puede comprender un anticuerpo con K447, con todo el K447 removido, o una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

[0086] "Afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su patrón de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique otra cosa, como se utiliza aquí, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su patrón Y puede estar representado generalmente mediante la constante de disociación (Kd). Se puede medir la afinidad por métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos aquí. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente unen el antígeno lentamente y tienden a disociar fácilmente, aunque los anticuerpos de alta afinidad generalmente unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer mayormente unidos. Una variedad de métodos para medir la afinidad de unión se conocen en la técnica, cualquiera de las cuales se puede utilizar para propósitos de la presente invención. Las realizaciones de ejemplo e ilustrativas específicas para medir la afinidad de unión se describen en lo siguiente.

196

[0087] En una realización, el "Kd" o "valor Kd" de acuerdo con esta invención se mide por un ensayo de unión de antígeno radiomarcado (RIA) desarrollado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo. La solución de afinidad de unión de los Fab para antígeno se miden al equilibrar Fab con una concentración mínima de antígeno marcado (^{125}I) en la presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado, luego capturar el antígeno de unión con una placa cubierta de anticuerpo anti-Fab (ver, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas multipozo MICROTITER® (Thermo Scientific) se recubren durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab capturante (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9.6), y posteriormente bloqueo con 2% (p/v) albúmina de suero bovino en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM [^{125}I]-antígeno se mezclan con diluciones seriales de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab- 12, en Presta et al, Cáncer Res. 57:4593-4599 (1997)). El Fab de interés luego se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar puede continuar durante un periodo mayor (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. Después de esto, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución luego se remueve y la placa se lava ocho veces con 0.1% TWEEN-20™ en PBS. Cuando se han secado las placas, se agrega 150 µl/pozo de centelleo (MICROSCINT-20™; Packard), y las placas se cuentan en el contador TOPCOUNT ™ gamma (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que da menos de o igual a 20% de unión máxima se seleccionan para uso en ensayos de unión competitivos.

197

[0088] De acuerdo con otra realización, el valor Kd o Kd se mide al utilizar ensayos de resonancia plasmón de superficie utilizando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®- 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con antígeno inmovilizado CM5 chips a ~10 unidades de respuesta (RU). En resumen, se activan chips biosensores dextrano carboximetilados (CM5, BIACORE, Inc.) con clorhidrato N-etil-N'- (3-dimetilaminopropil)- carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM acetato de sodio, pH 4.8, a 5 µg/ml (~0.2 µM) antes de inyección en una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para alcanzar aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Luego de la inyección del antígeno, se inyecta 1 M etanolamina para bloquear grupos que no reaccionan. Para mediciones cinéticas, diluciones seriales de dos veces de Fab (0.78 nM a 500 nM) se inyectan en PBS con 0.05% de tensoactivo TWEEN-20™ (PBST) a 25°C en una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (Software de evaluación BIACORE ® versión 3.2) al fijar simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula as el radio Wk_{0n}. Ver, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si el índice on excede 106 M^{-1} s^{-1} mediante el ensayo de resonancia de plasmón de superficie anterior, luego el índice on se puede determinar al utilizar una técnica de apagado fluorescente que mide el incremento o la reducción en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm paso de banda) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7.2, en la presencia de concentraciones incrementadas de antígeno según se mide en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con flujo de detención (Aviv

198

Instruments) o un espectrómetro 8000-series SLM-AMINCO™ (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

[0089] Un "índice on," "velocidad de asociación," "asociación de velocidad," o "k_{on}" de acuerdo con esta invención también se puede determinar como se describió anteriormente utilizando un sistema BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

[0090] El término "sustancialmente similar" o "sustancialmente el mismo," como se utiliza aquí, denota un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador), de tal manera que un experto en la técnica consideraría la diferencia entre los dos valores por ser de poco o sin significancia biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). la diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menos de aproximadamente 50%, menos de aproximadamente 40%, menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 20%, y/o menos de aproximadamente 10% como una función del valor de referencia /comparador.

[0091] La frase "sustancialmente reducida," o "sustancialmente diferente," como se utiliza aquí, denota un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente, uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora) de tal manera que un experto en la técnica consideraría la diferencia entre los dos valores a ser de significancia estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por

199

ejemplo, mayor de aproximadamente 10%, mayor de aproximadamente 20%, mayor de aproximadamente 30%, mayor de aproximadamente 40%, y/o mayor de aproximadamente 50% como una función del valor para la molécula de referencia/comparadora.

[0092] Una "estructura humana receptora" para los propósitos aquí es una estructura que comprende la secuencia de aminoácido de una estructura VL o VH derivada de una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura consensus humana. Una estructuras humana receptora "derivada de" una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura consensus humana puede comprender la misma secuencia de aminoácido de este, o este puede contener los cambios de secuencia de aminoácido preexistentes. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácido preexistentes son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. Cuando están presentes cambios de aminoácido preexistentes en un VH, preferiblemente aquellos cambios ocurren en solo tres, dos, o una de las posiciones 7 1H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácido en aquellas posiciones puede ser 71 A, 73T y/o 78A. En una realización, la estructura humana receptora VL es idéntica en secuencia a la estructura de inmunoglobulina humana VL o secuencia de estructura consensus humana.

[0093] Una "estructura consensus humana" es una estructura que representa los residuos de aminoácido que ocurren más comúnmente en una selección de obsecuencias de estructura VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de las secuencias es un subgrupo como en Kabat et al. , supra. En una realización, para

100

el VL, el subgrupo es subgrupo kappa I como en Kabat et al., supra. En una realización, para el VH, el subgrupo es subgrupo III como en Kabat et al. , supra.

[0094] Una "estructura consensus subgrupo III VH" comprende la secuencia consensus obtenido de las secuencias de aminoácido en el subgrupo III pesado variable de Kabat et al. En una realización, la secuencia de aminoácido de estructura consensus subgrupo III VH comprende por lo menos una porción o todo de cada una de las siguientes secuencias:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:31)-H1- WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:32)-H2-RFTISADTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:33)-H3- WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:34). Ver Figura 4.

[0095] Una "estructura consensus subgrupo I VL " comprende la secuencia consensus obtenida de las secuencias de aminoácido en el subgrupo I kappa liviano variable de Kabat et al. En una realización, la secuencia de aminoácido de estructura consensus subgrupo I H comprende por lo menos una porción o todo de las siguientes secuencias:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:35)-L1 -WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:36)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:37)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:38). Ver Figura 5.

[0096] Como se utiliza aquí, "conjunto de codón" se refiere a un conjunto de diferentes secuencias triplete de nucleótido utilizadas para codificar los aminoácidos variantes deseados. Un conjunto de oligonucleótidos se puede sintetizar, por ejemplo, mediante síntesis de fase sólida, que incluye las secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótido proporcionado por el conjunto de codón y que codificará el grupo

201

deseado de los aminoácidos. Una forma estándar de designación de codón es aquel del código IUB, que se conoce en la técnica y se describe aquí. Un conjunto de codón se representa típicamente mediante 3 letras mayúsculas en cursiva, por ejemplo, NNK, NNS, XYZ, DVK y similares. Un "conjunto de codón no aleatorizado," como se utiliza aquí, así se refiere a un conjunto de codón que codifica aminoácidos selecionados que parcialmente cumplen, preferiblemente completamente, el criterio para la selección de aminoácido se describe aquí. La síntesis de los oligonucleótidos con el nucleótido seleccionado "degenera" en ciertas posiciones es bien conocido en la técnica, por ejemplo, el alcance TRIM (Knappek et al. (1999) J. Mol. Biol. 296:57-86); Garrard & Henner (1993) Gene 128:103). Tales conjuntos de oligonucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codón se pueden sintetizar utilizando sintetizadores de ácido nucleico comercial (disponible de, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o se puede obtener comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleóticos sintetizado que tiene un conjunto de codón particular incluirá típicamente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferencias establecidas por el conjunto de codón dentro de la secuencia general. Los oligonucleótidos, como se utiliza de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación a una plantilla de ácido nucleico de dominio variable y también puede, pero no necesariamente, incluir sitios de restricción de enzima útiles para, por ejemplo, propósitos de clonación.

[0097] La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata et al. (1995 Protein Eng, 8(10): 1057-1062). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd tándem (V_H-CH 1 -V_{11}-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena liviana complementarios, forman un par de regiones de

202

unión de antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

[0098] Como se utiliza aquí, "librería" se refiere a una pluralidad de secuencias de fragmento de anticuerpo o anticuerpo (por ejemplo, polipéptidos de la invención), o los ácidos nucleicos que codifican estas secuencias, las secuencias son diferentes en la combinación de aminoácidos variantes que se introducen en estas secuencias de acuerdo con los métodos de la invención.

[0099] "Exhibición de fago" es una técnica por la cual los polipéptidos variantes se exhiben como proteínas de fusión a por lo menos una porción de proteína de recubrimiento en la superficie de fago, por ejemplo, fago filamentoso, partículas. Una utilidad de exhibición de fago se basa en el hecho que las colecciones grandes de variantes de proteínas aleatorizadas se pueden sortear rápidamente y eficientemente para aquellas secuencias que unen a un antígeno objetivo con afinidad alta. La exhibición de colecciones de proteína y péptido paguen fago se ha utilizado para detectar millones de polipéptidos para otras con propiedades de unión específicas. Se han utilizado métodos de exhibición de fago polivalentes para exhibir péptido aleatorizados pequeños y proteínas pequeñas a través de fusiones con el gen III o gen VIII de fago filamentoso. Wells y Lowman (1992) Curr. Opin. Struct. Biol. 3:355-362, y referencias citadas aquí. En una exhibición de fago monovalente, se fusiona una librería de proteína o péptido en un gen III o una porción del mismo, y se expresa en niveles bajos en la presencia de proteína III de gen tipo intacto ya que las partículas de fago exhiben una copia o ninguna de las proteínas de fusión. Los efectos de la avidez se reducen con relación al fago polivalente ya que la clasificación es sobre la base de afinidad de ligando intrínseca, y se utilizan vectores fagémidos, con manipulaciones de ADN

203

simplificadas. Lowman y Wells (1991) Methods: A companion to Methods in Enzymology 3:205-0216.

[00100] Un "fagémido" es un vector plásmido que tiene un origen bacteriano de replicación, por ejemplo, ColEl, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémido se puede utilizar en cualquier bacteriófago conocido, que incluye bacteriófago filamentoso y bacteriófago lambdoide. El plásmido también contendrá generalmente un marcador seleccionable para resistencia antibiótica. Los segmentos de ADN clonado en estos vectores se puede propagar como plásmidos. Cuando las células alojan estos vectores se proporcionan con todos los genes necesarios para la producción de partículas de fago, el modo de replicación de los cambios de plásmido para la introducción de la replicación de círculo para generar copias monocatenarias del ADN de plásmido y partículas de fago empacadas. El fagémido puede formar partículas de fago infecciosas o no infecciosas. Termal término incluye fagémidos, que contienen un gen de proteína de cubrimiento de fago o su fragmento ligado a un gen de polipéptido heterólogo como una fusión de gen de tal manera que el polipéptido heterólogo se exhibe en la superficie de la partícula de fago.

[00101] El término "vector de fago" significa una forma replicativa bicatenaria de bacteriofago que contiene un gen heterólogo y capaz de replicación. El vector de fago tiene un origen de fago de replicación y formación de partícula de fago. El fago es preferiblemente un bacteriófago filamentoso, tal como un fago M13, f1, fd, PD o su derivado, o un fago lambdoide, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc., o su derivado.

204

[00102] Como se utiliza aquí, "posición accesible de disolvente" se refiere a una posición de un residuo de aminoácido en las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de una fuente de fragmento de unión de anticuerpo o antígeno que se determina, con base en la estructura, conjunto de estructuras y/o estructura modelada del fragmento de unión de anticuerpo o antígeno, cuando está potencialmente disponible para acceso a disolvente y/o contacto con una molécula, tal como un antígeno específico a anticuerpo. Estas posiciones se encuentran típicamente en los CDR y en el exterior de la proteína. Las posiciones accesibles de disolvente de un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno, como se define aquí, se puede determinar utilizando cualquiera de un número de algoritmos conocidos en la técnica. En una realización, Se determinan las posiciones accesibles de disolvente utilizando coordinados de un dominio tridimensional de un anticuerpo, utilizando preferiblemente un programa de computador tal como el programa InsightII (Accelrys, San Diego, CA). También se pueden determinar las posiciones accesibles de disolvente utilizando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Lee y Richards (1971) J. Mol. Biol. 55, 379 y Connolly (1983) J Appl. Cryst. 16, 548). La determinación de posiciones accesibles de disolvente se puede desarrollar utilizando el software adecuado para el modelamiento de proteína e información estructural tridimensional obtenida de un anticuerpo. El software que se puede utilizar para estos propósitos incluye el software SYBYL Biopolymer Module (Tripos Associates). Generalmente, donde un algoritmo (programa) requiere un parámetro de tamaño de entrada de usuario, el "tamaño" de una sonda que se utiliza en el cálculo se establece en aproximadamente 1.4 Angstrom o más pequeño en radio. Adicionalmente, la determinación de regiones accesibles de disolventes y métodos de área utilizando software para computadores personales se han descrito por Pacios (1994) Comput. Chem. 18(4): 377-386.

102.

[00103] Un "factor angiogénico o agente" es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de vasos sanguíneos, por ejemplo, promueve la angiogenia, crecimiento celular endotelial, estabilidad de vasos sanguíneos, y/o vasculogenia, etc. Por ejemplo, factores angiogénicos, incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, VEGF y miembros de la familia VEGF, PlGF, familia PDGF, familia de factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), ligandos TIE (Angiopoyetinas), efrinas, ligando 4 como Delta 4 (DLL4), Del-1, factores de crecimiento de fibroblasto: acídico (aFGF) y básico (bFGF), Follistatina, factor que estimula la colonia de granulocito (G-CSF), factor de crecimiento de Hepatocito (HGF)/ factor de dispersión (SF), Interleukin-8 (IL-8), Leptina, Midkine, neurofilinas, factor de crecimiento Placental, factor de crecimiento de célula endotelial derivada de plaqueta (PD-ECGF), factor de crecimiento derivado de plaqueta, especialmente PDGF-BB o PDGFR- beta, Pleyotrofina (PTN), Progranulina, Proliferina, factor-alfa de crecimiento transformante (TGF-alfa), factor-beta de crecimiento transformante (TGF-beta), factor- alfa de necrosis de tumor (TNF-alfa), etc. También se incluiría factores que aceleran la curación de heridas, tal como hormona de crecimiento, factor I de crecimiento similar a insulina (IGF-I), VIGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), CTGF y miembros de su familia, y TGF-alfa y TGF- beta. Ver, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore (\99\) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39; Streit y Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179; Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364; Tonini et al. (2003) Oncogene 22:6549-6556 {por ejemplo, Tabla 1 que enlista factores angiogénicos conocidos); y, Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206.

[00104] Un "agente de anti-angiogenia" o "inhibidor de angiogenia" se refiere a una sustancia de peso molecular pequeño, un polinucleótido (que incluye, por

ejemplo, un ARN inhibidor (ARNi o siARN)), un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o sus proteínas de fusión, que inhiben la angiogenia, vasculogenia, o permeabilidad vascular indeseada, directamente o indirectamente. Se debe entender que el agente de anti-angiogenia incluye aquellos agentes que unen y bloquean la actividad angiogénica del factor angiogénico o su receptor. Por ejemplo, un agente de anti-angiogenia es un anticuerpo u otro antagonista para un agente angiogénico como se definió anteriormente, por ejemplo, anticuerpos para VEGF-A o para el receptor VEGF-A (por ejemplo, receptor KDR o receptor Flt-1), inhibidores anti-PDGFR tal como Gleevec™ (Mesilato Imatinib), moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU 11248 (malato sunitinib), AMG706, o aquellos descritos en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 2004/1 13304). Los agentes anti- angiogenia también incluyen inhibidores de angiogenia nativos, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Ver, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39; Streit y Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179 (por ejemplo, Tabla 3 que enlista la terapia anti-angiogénica en melanoma maligno); Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364; Tonini et al. (2003) Oncogene 22:6549-6556 (por ejemplo, la Tabla 2 enlista factores angiogénicos conocidos); y, Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200- 206 (por ejemplo, La Tabla 1 enlista los agentes anti-angiogénicos utilizados en ensayos clínicos).

[00105] El término "VEGF" o "VEGF-A" como se utiliza aquí se refiere a factores de crecimiento celular endotelial vascular humano de 165 aminoácidos y se relacionan 121-, 189-, y 206- factores de crecimiento celular endotelial vascular humano de aminoácido, como se describe por Leung et al. (1989) Science 246:1306, y Houck et al. (1991) Mol. Endocrin, 5:1806, junto con sus formas

207

procesadas y alélicas de ocurrencia natural. El término "VEGF" también se refiere a los VEGF de especies no humanas tal como ratón, rata, o primate. Algunas veces el VEGF se una especie específica se indica mediante términos tal como hVEGF para el VEGF humano, mVEGF para el VEGF de murino, etc. El término "VEGF" también se utiliza para referirse a formas truncadas del polipéptido que comprende 8 a 109 aminoácidos o 1 a 109 del factor de crecimiento celular endotelial vascular de 165 aminoácidos. La referencia a cualquiera de tales formas de VEGF se puede identificar en la presente solicitud, por ejemplo, por "VEGF (8-109)," "VEGF (1-109)" o "$VEGFi_{65}$." Las posiciones de aminoácido para un VEGF nativo "truncado" se enumeran según se indica en la secuencia VEGF nativa. Por ejemplo, la posición 17 de aminoácido (metionina) en VEGF nativo truncado también está en la posición 17 (metionina) en VEGF nativo. El VEGF nativo truncado tiene afinidad de unión para los receptores KDR y Flt-1 comparable con VEGF nativo.

[00106] un "anticuerpo anti-VEGF " es un anticuerpo que une a VEGF con afinidad y especificidad suficiente. En una realización, el anticuerpo anti-VEGF de la invención es el anticuerpo B20-4.1.1. En todavía otra realización, el anticuerpo anti-VEGF de la invención es el anticuerpo B20-4.1.1RR. En todavía otra realización, el anticuerpo anti-VEGF de la invención se puede utilizar como un agente terapéutico en objetivar e interferir con enfermedades o afecciones en donde se involucra la actividad VEGF. Un anticuerpo anti-VEGF no se une usualmente a otros homólogos VEGF tal como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tal como PlGF, PDGF o bFGF.

[00107] El anticuerpo anti-VEGF "Bevacizumab (BV)," también conocido como "rhuMAb VEGF" o "AVASTIN®," es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF

208

humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta et al. (1997) Cáncer Res. 57:4593-4599. Este comprende regiones de estructura IgGI humana mutada y regiones determinantes de complementariedad de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF de murino A.4.6.1 que bloque la unión del VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente 93% de la secuencia de aminoácido de Bevacizumab, que incluye la mayoría de las regiones de estructura, se deriva de IgG1 humano, y aproximadamente 7% de la secuencia se deriva del anticuerpo A4.6.1 de murino. El Bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149,000 daltons y se glucosila.

[00108] El término "polipéptido serie B20" como se utiliza aquí se refiere a un polipéptido, que incluye un anticuerpo que une a los polipéptidos serie VEGF. B20 que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos derivados de una secuencia de anticuerpo B20 o un anticuerpo derivado B20 descrito en la Publicación Estadounidense No. 20060280747, la Publicación Estadounidense No. 20070141065 y/o la Publicación Estadounidense No. 20070020267, el contenido de estas solicitudes de patentes se incorporan expresamente aquí como referencia. En una realización, el polipéptido serie B20 es B20-4.1 según se describe en la Publicación Estadounidense No. 20060280747, la Publicación Estadounidense No. 20070141065 y/o la Publicación Estadounidense No. 20070020267.

[00109] El término "B20-4.1.1 " como se utiliza aquí se refiere a que un anticuerpo que une a VEGF y comprende un anticuerpo en donde HVR-H1 es SEQ ID NO:1; HVR-H2 es SEQ ID NO:2; HVR-H3 es SEQ ID NO:3; HVR-L1 es SEQ ID NO:4; HVR-L2 es SEQ ID NO:6; HVR-L3 es SEQ ID NO:7.

209

[00110] El término "B20-4.1.1RR" como se utiliza aquí se refiere a que un anticuerpo une a VEGF y comprende un anticuerpo en donde HVR-H1 es SEQ ID NO: 1; HVR-H2 es SEQ ID NO:2; HVR-H3 es SEQ ID NO:3; HVR-L1 es SEQ ID NO:5; HVR-L2 es SEQ ID NO:6; HVR-L3 es SEQ ID NO:7.

[00111] El término "G6-31 " como se utiliza aquí es uno de los polipéptidos serie G-6 según se describe en la Publicación Estadounidense No. 20060280747, la Publicación Estadounidense No. 20070141065 y/o la Publicación Estadounidense No. 20070020267. Otros polipéptidos serie G-6, según se describe en la Publicación Estadounidense No. 20060280747, la Publicación Estadounidense No. 20070141065 y/o la Publicación Estadounidense No. 20070020267 que incluye, pero no se limita a, G6-8 y G6-23.

[00112] El término "actividad biológica " y "biológicamente activo," con respecto a un polipéptido VEGF, se refiere a copropiedades físicas/químicas y funciones biológicas asociadas con VEGF.

[00113] Un "antagonista VEGF " se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, abrogar, reducir o interferir con actividades VEGF que incluye, pero no se limita a, su unión a uno o más receptores VEGF. Los antagonistas VEGF incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-VEGF y sus fragmentos de unión a antígeno, moléculas de receptor y derivados que unen específicamente a VEGF que por lo tanto secuestra su unión a uno o más receptores, los anticuerpos del receptor anti-VEGF y antagonistas del receptor VEGF tal como inhibidores de molécula pequeña de las quinasas tirosina VEGFR. El término "antagonista VEGF," como se utiliza aquí, incluye específicamente moléculas, que incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, otros polipéptidos de unión, péptidos, y

210

moléculas pequeñas sin péptido, que unen a VEGF y son capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, abrogar, reducir o interferir con las actividades de VEGF. Así, el término "actividades VEGF" incluye específicamente actividades biológicas mediadas por VEGF (como se definió aquí anteriormente) de VEGF. En una realización, el antagonista VEGF es anticuerpo anti-VEGF B20-4.1.1. En todavía otra realización, el antagonista VEGF es anticuerpo anti-VEGF B20-4.1.1RR.

[00114] Como se utiliza aquí, "tratamiento" (y variaciones tal como "tratar" o "que trata") se refiere una intervención clínica en un intento para alterar el curso natural del individuo o célula a ser tratado, y se puede desarrollar por profilaxis o durante el curso de patología clínica. Los efectos deseables de tratamiento incluyen evitar la ocurrencia o recurrencia de enfermedad, alivio de síntomas, disminución de cualesquier consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, evitar metástasis, reducir la velocidad de progresión de la enfermedad, alivio o paliación del estado de la enfermedad, y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, se utilizan los anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o hacer lenta la progresión de una enfermedad o trastorno.

[00115] Administración "crónica" se refiere la administración de los agentes en un modo continuo según cuando opone a un modo agudo, con el fin de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo extendido. Administración "Intermitente" es el tratamiento que no se hace consecutivamente sin interrupción, pero es cíclico en naturaleza.

[00116] Un "trastorno" condiciones cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento (por ejemplo, mamíferos quienes sufren de o necesitan profilaxis

211

contra la angiogenia anormal (angiogenia excesiva, inapropiada o no controlada) o permeabilidad vascular). Esto incluye trastornos o enfermedades agudas o crónicas que incluye aquellas afecciones patológicas, que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos a ser tratados aquí incluyen tumores benignos y malignos; malignidades linfoides y sin leucemias; y, en particular, metástasis de tumor (por ejemplo, cáncer).

[00117] Los términos "trastorno proliferativo de célula" y "trastorno proliferativo" se refiere a trastornos que se asocian con algún grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo de célula es cáncer.

[00118] "Tumor," como se utiliza aquí, se refiere a todo el crecimiento celular neoplásico y la proliferación, si es maligno o benigno, y todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos. El términos "cáncer," "canceroso," "trastorno proliferativo de célula," "trastorno proliferativo" y ""tumor" no son mutuamente exclusivos como se refiere aquí.

[00119] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refiere a o describe la afección fisiológica en mamífero que se caracteriza típicamente mediante crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Más particular ejemplos de tales cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de célula epidermoide, cáncer de pulmón (que incluye cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, y carcinoma del pulmón escamoso), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer de estómago o gástrico (que incluye cáncer gastrointestinal y cáncer estromal gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de

212

vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer renal o de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroide, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, melanoma, melanoma de esparcido superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginoso acral, melanomas nodulares, así como también Linfoma de célula B (que incluye linfoma no-Hodgkin de grado bajo/folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL) NHL; NHL de grado intermedio/folicular; NHL grado intermedio difuso; NHL de alto grado inmunoblástico; NHL de alto grado linfoblástico; NHL ce célula no dividible pequeño de alto grado; NHL de enfermedad de masa; linfoma de célula de manto; linfoma relaciona con SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); Leucemia de célula capilar; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo post-transplante (PTLD), así como también proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como aquel asociado con tumores de cerebro), y Síndrome de Meigs.

[00120] Un "individuo," "sujeto," o "paciente" es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales de granja (tal como vacas), animales de deporte, mascotas (tal como gatos, perros, y caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, un mamífero es un humano.

[00121] El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma para permitir la actividad biológica del ingrediente activo a ser efectivo, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente

tóxicos en un sujeto al que se administraría la formulación. Tales formulaciones pueden ser estériles.

[00122] Una formulación "estéril" es aséptica o libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

[00123] Una "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones o durante periodos necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

[00124] Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de una sustancia/molécula de la invención puede variar de acuerdo con factores tal como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula, para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva abarca una cantidad en la que cualesquier perjudiciales o tóxicos de la sustancia/molécula se ponderan por los efectos terapéuticamente benéficos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante periodos necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Típicamente, pero no necesariamente, debido a que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes de o al inicio de la etapa de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva sería menor de la cantidad terapéuticamente efectiva.

[00125] La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

214

[00126] "Portadores" como se utiliza aquí incluyen portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes, o estabilizadores que no son tóxicos para la célula o el mamífero a ser expuesto en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Frecuentemente el portador fisiológicamente aceptable es una solución amortiguada de pH acuoso. Ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen amortiguantes tal como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluye ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tal como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal como povidona; aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluye glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; alcoholes de azúcar tal como manitol o sorbitol; counteriones formadores de sal tal como sodio; y/o tensoactivos no iónicos tal como TWEEN™, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS™.

[00127] Una "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivo que es útil para el suministro de un fármaco (tal como un polipéptido VEGF o su anticuerpo) a un mamífero. Los componentes de la liposoma se dispone comúnmente en una formación bicapa, similar a la disposición de lípido de membranas biológicas.

[00128] El término "composición antineoplásica" se refiere a una composición útil en tratar el cáncer que comprende por lo menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, "agente anti- cáncer." Ejemplos de agentes terapéuticos (agentes anti-cáncer) incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores de crecimiento, agente citotóxicos, agentes utilizados en terapia de radiación, agentes anti-angiogenia, agentes apoptócicos, agentes anti-

tubulina, y otros agentes para tratar el cáncer, tal como anticuerpos anti-HER-2, anticuerpos anti- CD20, un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor tirosina quinasa), inhibidor HERI /EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™), inhibidores de factor de crecimiento derivados de plaqueta (por ejemplo, Gleevec™ (Mesilato Imatinib)), un inhibidor COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citoquinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que unen a uno o más de los siguientes objetivos ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o VEGF receptor(s), TRAIL/ Apo2, y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. también se incluyen sus combinaciones en la invención.

[00129] El término "agente citotóxico" como se utiliza aquí se refiere a una sustancia que inhibe o evita una función celular y/o origina muerte o destrucción celular. El término está destinado a incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At^{21} ^{1}, 1^{131}, 1^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, vinca alcaloides (vincristina, vinblastina, etoposida), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y sus fragmentos tal como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas tal como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de bacterias, hongos, plantas u origen animal, que incluye fragmentos y/o sus variantes, y los varios agentes antineoplásicos o antineoplásico descritos adelante. Otros agentes citotóxicos se describen adelante. Un agente tumoricida origina la destrucción de células de tumor.

[00130] Una "toxina" substancies cualquier sustancia capaz de tener un efecto perjudicial en el crecimiento o proliferación de una célula.

216

[00131] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilatantes tal como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos alquilo tal como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tal como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluye altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-1 1 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC- 1065 (que incluye sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tal como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido mecloretamina, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostazas uracilo; nitrosoureas tal como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimnustina; antibióticos tal como los antibióticos enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega II (ver, por ejemplo, Nicolaou et al., Angew. Chem Intl. Ed. Engl, 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor integrina oral alfa-4; dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; así como también cromóforo neocarzinostatina y cromóforos antibióticos enedina cromproteína relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas,

217

cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L- norleucina, doxorubicina (que incluye ADRIAMICINA®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de liposoma doxorubicina HCl (DOXIL®), liposomal doxorubicin TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposomal pegilada (CAEL YX®), y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tal como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tal como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona, y 5-fluorouracilo (5-FU); combretastatina; análogos de ácido fólico tal como denopterina, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; análogos purina tal como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos pirimidina tal como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; pirógenos tal como calusterona, dromostanolona propionato, epitiostanol, mepitiostano, testolactono; anti-adrenales tal como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glicosida aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tal como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2'- triclorotrietilamina; tricotecenes (especialmente toxina T-2, verracurin A,

218

roridina A y anguidina); uretan; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitocina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartícula construida por ingeniería de albumina de paclitaxel (ABRAXANE™), y docetaxel (TAXOTERE®); cloranbucil; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes platino tal como cisplatina, oxaliplatina (por ejemplo, ELOXATIN®), y carboplatina; vincas, que evitan la polimerización de tubulina de microtúbulos formados, que incluye vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), y vinorelbina (NAVELBINE®); etoposida (VP- 16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorin; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tal como ácido retinoico, que incluye bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tal como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico /zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo citocina nucleósido 1,3-dioxolano); oligonucleótidos anticodificantes, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tal como, por ejemplo, PKC-alpha, Raf, H-Ras, y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™)); y VEGF-A que reduce la proliferación celular; vacunas tal como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia de gen, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; inhibidor topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor COX-2 (por ejemplo , celecoxib o etoricoxib), inhibidor proteosoma (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib

(RI 1577); orafenib, ABT510; inhibidor Bcl-2 tal como oblimersen sodio (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores EGFR; inhibidores tirosina quinasa; inhibidores quinasa serina-treonina tal como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores farnesiltransferasa tal como lonafarnib (SCH 6636, SARAS AR™); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores; así como también combinaciones de dos o más de los anteriores tal como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatina (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina, y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como también combinaciones de dos o más de los anteriores.

[00132] Los agentes quimioterapéuticos según se define aquí incluyen "agentes anti-hormonales" o "terapéuticos endocrino" que actúan para regular, reducir, bloquear, o inhibir los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer. Ellos mismos pueden ser hormonas, que incluye, pero no se limita a: anti-estrógenos y moduladores del receptor de estrógeno selectivo (SERM), que incluye, por ejemplo, tamoxifen (que incluye NOLVADEX® tamoxifen), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifen, trioxifeno, keoxifeno, LYI 17018, onapristona, y FARESTON- toremifeno; inhibidores aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tal como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® acetato megestrol, exemestano AROMASIN®, formestanie, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®; y anti- andrógenos tal como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como también troxacitabina (un análogo citocina nucleósido 1 ,3-dioxolano);

120

oligonucleótidos anticodificantes, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tal como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tal como un inhibidor de expresión VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de expresión HER2; vacunas tal como vacunas de terapia de gen, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor 1 de topoisomerasa LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; Vinorelbina y Esperamicinas (ver Patente Estadounidense No. 4,675,187), y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como también combinaciones de dos o más de los anteriores.

[00133] Un "agente inhibidor de crecimiento" cuando se utiliza aquí se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa VEGF) in vitro o in vivo. Así, el agente inhibidor de crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células (tal como una célula que expresa VEGF) en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores de crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar diferente de la fase S), tal como agentes que inducen detención Gl y detención de fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores topoisomerasa II tal como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposida, y bleomicina. Aquellos agentes que detienen el Gl también se dividen en detención de fase S, por ejemplo, agentes alquilatantes de ADN tal como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede encontrar información adicional en Mendelsohn y Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami et al. (W. B. Saunders, Philadelphia,

221

1995), por ejemplo, p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados del nuevo árbol tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del árbol de tejo Europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El Paclitaxel y docetaxel promueven el ensambre de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabiliza los microtúbulos al evitar la despolimerización, que resulta en a inhibición de mitosis en las células.

[00134] La "patología" de una enfermedad incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Para el cáncer, esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anormal o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de células vecinas, la liberación de citoquinas u otros productos secretores en niveles anormales, supresión o alteración de respuesta inflamatoria o inmunológica, etc.

[00135] El término "profármaco" como se utiliza en esta solicitud se refiere a una forma de precursor o derivado de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células de tumor comparado con el fármaco padre y es capaz de ser activado enzimáticamente o convertido en la forma padre más activa. Ver, por ejemplo, Wilman (1986) "Prodrugs in Cáncer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375- 382, 615th Meeting Belfast y Stella et al. (1985). "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247- 267, Humana Press. Los profármacos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados de D-aminoácido, profármacos glucosilados, profármacos que contienen β-lactam, profármacos que

212

contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, 5-fluorocitocina y otros profármacos 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que se puede derivar en una forma de profármaco para uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

[00136] Una "molécula pequeña" se define aquí por tener un peso molecular por encima de aproximadamente 500 Daltons.

[00137] "Purificado" significa que una molécula está presente en una muestra en una concentración de por lo menos 95% en peso, o por lo menos 98% en peso de la muestra en la que está contenida.

[00138] Una molécula de ácido nucleico “aislada" es una molécula de ácido nucleico que se separa de por lo menos otra molécula de ácido nucleico con el que este se asocia ordinariamente, por ejemplo, en su ambiente natural. Una molécula de ácido nucleico aislada incluye adicionalmente una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan ordinariamente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente estracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural.

[00139] El término "vector," como se utiliza aquí, está destinado a referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que este se liga. Un tipo del vector es un "plásmido," que se refiere a un ADN bicatenario circular en el que se pueden ligar los segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de

223

vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que ellos se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores mamíferos episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se pueden integrar en el genoma de una célula anfitriona luego de la introducción de la célula anfitriona, y por lo tanto se replican junto con el genoma. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que ellos se ligan operativamente. Tales vectores s refieren aquí como "vectores de expresión recombinante," o simplemente, "vectores de expresión." En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" se puede utilizar intercambiablemente como el plásmido que es la forma más comúnmente utilizada del vector.

[00140] "Polinucleótido," o "ácido nucleico," como se utiliza intercambiablemente aquí, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser deoxiribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se puede incorporar en un polímero mediante polimerasa de ADN o ARN o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tal como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura de nucleótido se puede impartir alterantes o después de ensamblar del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir mediante componentes sin nucleótido. Un polinucleótido puede comprender modificaciones hechas después de síntesis, tal como conjugación en una marca.

Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "mayúsculas," sustitución de uno o más de nucleótidos de ocurrencia natural con un análogo, modificaciones de internucleótido tal como, por ejemplo, aquellos con ligados no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con ligados cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen grupos funcionales pendientes, tal como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, ply-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantates, aquellos con ligados modificados (por ejemplo, ácido nucleicos anoméricos alfa, etc.), así como también formas no modificadas de los polinucleótidos. Adicionalmente, cualquiera de los grupos hidroxilo ordinariamente presentes en los azúcares se pueden reemplazar, por ejemplo, mediante grupos fosfonato, grupos fosfato, protegido por grupos protectores estándar, o activado para preparar ligados adicionales para nucleótidos adicionales, o se puede conjugar con soportes sólidos o semi-sólidos. El Terminal OH 5' y 3' se puede fosforilar o sustituir con aminas o grupos funcionales de taponado orgánico de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también se pueden derivar de grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o deoxiribosa que se conocen generalmente en la técnica, que incluye, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'- azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclicos, azúcares anoméricos α, azúcares epiméricos tal como arabinosa, xilosas o azúcares piranosa, lixosas, azúcares furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos, y análogos nucleósidanálogos básicos tal como metil ribosida. Uno o más ligados fosfodiéster que se pueden reemplazar mediante grupos de ligado alternativos. Estos grupos de ligado alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en

donde se reemplaza el fosfato por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR_2 ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO, o CH2 ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente un ligado éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los ligados en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precendente aplica a todos los polinucleótidos referidos aquí, que incluye ARN y ADN.

[00141] "Oligonucleótido," como se utiliza aquí, generalmente se refiere polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente polinucleótidos sintéticos que son generalmente, pero no necesariamente, menos de aproximadamente 200 nucleótidos en longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente exclusivos. La descripción anterior para los polinucleótidos es igual y completamente aplicable a los oligonucleótidos.

[00142] "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácido" con respecto a la secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácido en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considera cualesquier sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. La alineación para propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácido se puede alcanzar en varias formas que están dentro de la experticia de la técnica, por ejemplo, utilizando software de computador disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para las secuencias de

alineación, que incluye cualesquier algoritmos necesarios para alcanzar la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que son comparadas. Para propósitos aquí, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácido se generan utilizando el programa de computador para comparación de secuencia ALIGN-2. El programa de computador para comparación de secuencia ALIGN-2 se autoriza por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con al documentación del usuario en el U.S. Copyright Office, Washington D. C, 20559, donde se registra bajo U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para uso en un sistema de operación UNIX, preferiblemente digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

[00143] En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencia de aminoácido, el % de identidad de secuencia de aminoácido de una secuencia de aminoácido dada A a, con, o contra una secuencia de aminoácido dada B (que alternativamente se puede nombrar como una secuencia de aminoácido dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácido para, con, o contra una secuencia de aminoácido dada B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y,

donde X es el número de residuos de aminoácido clasificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencia ALIGN-2 en el que la alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácido en B. Se apreciará que la longitud de la secuencia de aminoácido A no

224

es igual a la longitud de la secuencia de aminoácido B, el % de identidad de secuencia de aminoácido de A a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácido de B a A. A menos que se indique específicamente otra cosa, todos los valores del % de identidad de secuencia de aminoácido utilizados aquí se obtienen según se describe en el párrafo inmediatamente precedente utilizando el programa de computador ALIGN-2.

[00144] La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante ligada operablemente en un organismo anfitrión particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión de ribosoma. Las células eucarióticas se conocen por utilizar promotores, señales de poliadenilación y mejoradores.

[00145] El ácido nucleico se "une operablemente" cuando este se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, ADN para una presecuencia o líder secretor se une operablemente al ADN para un polipéptido si este se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o mejorador se liga operablemente a una secuencia codificante que afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma se liga operablemente a una secuencia codificante si esta se posiciona con el fin de facilitar traducción. Generalmente, "ligado operablemente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguos y en fase de lectura. Sin embargo, los mejoradores no son contiguos. El ligado se lleva a cabo mediante ligado de los sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se utilizan adaptadores de oligonucleótido sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

228

[00146] Como se utiliza aquí, las expresiones "célula," "estirpe celular," y "cultivo celular" se utilizan intercambiablemente y todas tales designaciones incluyen progenia. Así, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos se derivan de estos con respecto al número de transferencias. También se entiende que toda la progenia no puede ser precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenia mutante que tiene la misma función o actividad biológica cuando se detecta en la célula originalmente transformada. Cuando se destinan designaciones distintas, será claro del contexto.

[00147] El término "concurrentemente" se utiliza aquí para referirse a la administración de dos o más agentes terapéuticos, donde por lo menos parte de la administración se sobrepone en el tiempo. De acuerdo con lo anterior, la administración concurrente incluye un régimen de dosificación cuando la administración de uno o más agentes continúa después de discontinuar la administración de uno o más de otros agentes.

[00148] "Recurrencia del Cáncer" aquí se refiere a un retorno del cáncer luego de tratamiento. En una realización, la recurrencia del cáncer incluye regreso del cáncer en la mama, así como también recurrencia distante, cuando el cáncer regresa fuera de la mama.

Composiciones de la invención

[00149] La invención abarca realizaciones de anticuerpo y polinucleótido aislado. En una realización, se purifica un anticuerpo anti-VEGF.

229

[00150] Esta invención también abarca composiciones, que incluye composiciones farmacéuticas, que comprende un anticuerpo anti-VEGF; y polinucleótidos que comprende secuencias que codifican un anticuerpo anti-VEGF. Como se utiliza aquí, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que unen a VEGF, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden las secuencias que codifican uno o más anticuerpos que unen a VEGF. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente portadores adecuados, tal como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluye amortiguantes, que son bien conocidos en la técnica.

[00151] En una realización, los anticuerpos anti-VEGF de la invención son monoclonales. En todavía otra realización, los anticuerpos anti-VEGF son policlonales. También se abarcan dentro del alcance de la invención los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y $F(ab')_2$ de los anticuerpos anti-VEGF proporcionados aquí. Estos fragmentos de anticuerpo se pueden crear por medios tradicionales, tal como digestión enzimática, o se pueden generar mediante técnicas recombinantes. Tales fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para el diagnóstico y los propósitos establecidos adelante. En una realización, un anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo quimérico, humanizado, o humano.

[00152] Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de ocurrencia natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Así, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos discretos.

230

[00153] Los anticuerpos monoclonales de ejemplo derivados de una colección de fago se proporcionan aquí y se describen en el Ejemplo 1. Aquellos anticuerpos se designan B20- 4.1.1 y B20-4.1.1RR. Las secuencias de los dominios de cadena pesada y liviana de B20-4.1.1 y B20-4.1.1RR se muestran en las Figuras 1 y 6-9.

[00154] Para la detección de anticuerpos que unen a un epítopo particular en el antígeno de interés, se puede desarrollar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como aquel descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Alternativamente, el mapeo de epítopo, por ejemplo, según se describe en Champe et al. (1995) J Biol. Chem. 270:1388-1394, se puede desarrollar para determinar si el anticuerpo une un epítopo de interés. Se proporcionan adelante realizaciones de ejemplo adicionales de anticuerpos anti-VEGF.

Realizaciones específicas de anticuerpos anti-VEGF

[00155] En una realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende:

(i) una secuencia HVR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 ; (ii) una secuencia HVR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:2;

(iii)una secuencia HVR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:3.

(iv) una secuencia HVR-L1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:4.

(v)una secuencia HVR-L2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:6.

(vi) una secuencia HVR-L3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:7.

231

[00156] En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende:

(i) una secuencia HVR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 ;

(ii) una secuencia HVR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:2;

(iii)una secuencia HVR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:3. (iv) una secuencia HVR-L1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:5.

(v)una secuencia HVR-L2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:6.

(vi) una secuencia HVR-L3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:7.

[00157] La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs: 1 a 7 se enumeran con respecto al HVR individual (es decir, H1, H2 o H3) según se indica en la Figura 1, la numeración es consistente con el sistema de numeración Kabat como se describe aquí.

[00158] En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden secuencia HVR de cadena pesada como se describe en la Figura 1.

[00159] Algunas realizaciones de los anticuerpos de la invención comprenden un dominio variable de cadena liviana del anticuerpo 4D5 humanizado (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (también referido en la Patente Estadounidense No. 6,407,213 y Lee et al.J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93) como se describe en la SEQ ID NO:39 adelante.

[00160] [1]Asp He Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr He Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu He Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly

132

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr He Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln ***His*** Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu He Lys[107] (SEQ ID NO:39) (se destacan los residuos HVR).

[00161] En una realización, la secuencia de dominio variable de cadena liviana huMAb4D5-8 se modifica en una o más de las posiciones 30, 66 y 91 (Asn, Arg y His según se indica en negrilla/cursiva anterior, respectivamente). En una realización, la secuencia huMAb4D5-8 modificada comprende Ser en la posición 30, Gly en la posición 66 y/o Ser en la posición 91. De acuerdo con lo anterior, en una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia descrita en la SEQ ID NO:40 adelante:

[00162] [1]Asp He Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr He Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val ***Ser*** Thr Ala Val Ala Tip Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu He Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr He Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln ***Ser*** Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu He Lys[107] (SEQ ID NO:40) (se destacan los residuos HVR)

[00163] Los residuos sustituidos con respecto a huMAb4D5-8 se indican en negrilla/cursiva anterior.

[00164] Los anticuerpos de la invención pueden comprender cualquier secuencia de dominio variable de estructura adecuada, que proporciona la actividad de unión

al VEGF se retiene sustancialmente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden una secuencia consensus de estructura de cadena pesada subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consensus de estructura comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización, estos anticuerpos comprenden las secuencias de estructura de dominio variable de cadena pesada de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (también referido en la Patente Estadounidense Nos. 6,407,213 & 5,821,337, y Lee et al, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93). En una realización, estos anticuerpos comprenden adicionalmente una secuencia consensus de estructura de cadena liviana humana. En una realización, estos anticuerpos comprenden las secuencias HVR de cadena liviana de huMAb4D5-8 según se describe en Patente Estadounidense Nos. 6,407,213 & 5,821,337). En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias de dominio variable de cadena liviana de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (también referido en la Patente Estadounidense Nos. 6,407,213 & 5,821,337, y Lee et al, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93).

[00165] En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada, en donde la secuencia de estructura comprende las secuencias de SEQ ID NOS:8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, y/o 26 (Figuras 2a y 2b), y las secuencias HVR H1, H2 y H3 son las SEQ ID NOS: 1, 2 y/o 3, respectivamente. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena liviana, en donde la secuencia de estructura comprende las secuencias de SEQ ID NOS:27, 28, 29 y/o

30 (Figure 3), la secuencia HVR L1 es SEQ ID NOS:4 o 5, la secuencia HVR L2 es SEQ ID NO:6, y la secuencia HVR L3 es SEQ ID NO:7.

[00166] En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:43. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NO:44 o 45. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:43 y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NO:45. En todavía otra realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:44 y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NO:45.

[00167] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que compete con cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente para la unión a VEGF. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que une al mismo epítopo en VEGF como cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

Fragmentos de Anticuerpo

[00168] La presente invención abarca fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo se pueden generar por medios tradicionales, tal como digestión enzimática, o mediante técnicas recombinantes. En ciertas circunstancias existen ventajas al utilizar fragmentos de anticuerpo, que anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite depuración rápida, y puede

liderar mejor acceso a los tumores sólidos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpo, ver Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134.

[00169] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivan por vía de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan et al, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente mediante células anfitrionas recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv todos se pueden expresar en y se secretan de E. coli, permitiendo así la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las colecciones de fago de anticuerpo discutidas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de E. coli y se acoplan químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., Bio/Technology 10:163- 167 (1992)). De acuerdo con otra investigación, los fragmentos $F(ab')_2$ se pueden aislar directamente del cultivo de célula anfitriona recombinante. El fragmento Fab y $F(ab')_2$ con residuos de epítopo que unen al receptor salvaje que comprende vida útil in vivo incrementada se describen en la Patente Estadounidense No. 5,869,046. Otras técnicas para la producción de los fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el practicante experto. En ciertas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Ver WO 93/16185; Patente Estadounidense Nos. 5,571,894; y 5,587,458. Los Fv y scFv son solo las especies con sitios de combinación intacto que están desprovistas de regiones constantes; así, ellos pueden ser adecuados para la unión no específica reducida durante uso in vivo. Las proteínas de fusión scFv se pueden construir para producir la fusión de una proteína efectora en el terminal amino o el terminal carboxi de un scFv. Ver

Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,641,870, por ejemplo. Tales anticuerpos lineales pueden ser anticuerpos monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos humanizados

[00170] La invención abarca anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica varios métodos para anticuerpos no humanos humanizantes. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácido introducidos en una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácido no humanos frecuentemente se refieren a residuos "importes", que se toman típicamente de un dominio variable "importe". La humanización se puede desarrollar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al. (1986) Nature 321 :522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 22,2:323-321; Verhoeyen et al. (1988) Science 239: 1534-1536), mediante secuencias de región hipervariable sustituyente para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con lo anterior, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente Estadounidense No. 4,816,567) en donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR se sustituyen mediante sitios análogos en anticuerpos roedor.

[00171] La elección de dominios humanos variables, livianos y pesados, a ser utilizados en la elaboración de los anticuerpos humanizados puede ser importante

237

para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método así llamado "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se detecta contra la colección completa de secuencias de dominio variable humano conocido. La secuencia humana que es más cerrada que del roedor luego se acepta como la estructura humana para el anticuerpo humanizado. Ver, por ejemplo, Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia e/ α/. (1987) J. Mol. Biol. 196:901. Otro método utiliza una estructura particular derivada de la secuencia consensus de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de las cadena pesada o liviana. La misma estructura se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes. Ver, por ejemplo, Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. ScL USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J Immunol, 151:2623.

[00172] Es generalmente adicionalmente deseable que los anticuerpos se puede humanizar con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar esta meta, de acuerdo con un método, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias parental y varios productos humanizados conceptuales utilizando tres modelos dimensionales de las secuencias humanizadas y parentales. Están comúnmente disponibles los modelos de inmunoglobulina tridimensional y son familiares para aquellos expertos en la técnica. Los programas de computador están disponibles para ilustrar y exhibir estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionada. La inspección de estas exhibiciones permite el análisis del posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influencian la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unir su antígeno. De esta forma, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar del receptor y se alcanzan secuencias importes

238

de tal manera que el anticuerpo deseado característico, tal como afinidad incrementada para el antígeno objetivo. En general, los residuos de región hipervariable se involucran directamente y más sustancialmente en influenciar la unión de antígeno.

Anticuerpos humanos

[00173] Los anticuerpos humanos de la invención se pueden construir al combinar secuencias de dominio variable clon Fv seleccionadas de colecciones de exhibición de fago derivado de humano con secuencias de dominio constante humano según se describió anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden hacer mediante el método de hibridoma. Las estirpes celulares heteromieloma de ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito, por ejemplo, por Kozbor, J Immunol, 133: 3001 (1984); Brodeur et ah, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner et ah, J. Immunol., 147: 86 (1991).

[00174] Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, luego de inmunización, para producir una repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigota del gen de región de unión de cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones mutantes de línea germinal y quimérica resulta en inhibición completa de la producción de anticuerpo endógena. La transferencia del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana se dispone en tales ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de los anticuerpos humanos luego de exposición a antígeno. Ver, por ejemplo,

239

Jakobovits et ah, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A, 90: 2551 (1993); Jakobovits et ah, Nature, 362: 255 (1993); Bruggermann et ah, Year in Immunol., 7: 33 (1993).

[00175] La mezcla génica también se puede utilizar para derivar anticuerpos humanos de no humanos, por ejemplo roedores, anticuerpos, en donde el anticuerpo humano tiene afinidades similares y especificidades para el anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que también se llama "impresión de epítopo," la región variable de cadena pesada o liviana de un fragmento no humano obtenido por técnicas de exhibición de fago como se describe aquí se reemplaza con un repertorio de genes de dominio V humanos, creando una población de quimeras Fab o scFv de cadena humana/cadena no humana. La selección con antígeno resulta en el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena humana/cadena no humana en donde la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido luego de la remoción de la cadena no humana correspondiente en el clon de exhibición de fago primario, es decir los gobiernos de epítopo (impresiones) la elección del patrón de cadena humana. Cuando se repite el proceso con el fin de reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (ver PCT WO 93/06213 publicado en Abril 1, 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injerto CDR, esta técnica proporciona completamente anticuerpos humanos, que no tienen residuos FR o CDR de origen no humano.

Anticuerpos biespecíficos

[00176] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen afinidades de unión durante por lo menos dos antígenos diferentes. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o

240

humanizados. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es para el VEGF y el otro es para cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos puede unir a dos diferentes epítopos de VEGF. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos para las células que expresan VEGF. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a VEGF y un brazo que une un agente citotóxico, tal como, por ejemplo , saporina, anti-interferón-α, vinca alcaloide, cadena ricina A, metotrexato o hapteno de isótopo radioactivo. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o los fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

[00177] Se conocen en la técnica métodos para elaborar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co- expresión de dos pares de cadena liviana-cadena pesada de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature, 305: 537 (1983)). Debido a la clasificación aleatoria de las cadenas pesada y liviana de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que usualmente se hace mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante complcado, y los rendimientos de producto son bajos. Se describen procedimientos similares en la WO 93/08829 publicada en Mayo 13, 1993, y en Traunecker et al. , EMBO J, 10: 3655 (1991).

[00178] De acuerdo con un alcance diferente, los dominios de anticuerpo variables con las especificidades de unión deseada (sitios de combinación de anticuerpo-

141.

antígeno) se fusionan a las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones la bisagra, CH2, y CH3. En ciertas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CHI), que contiene el sitio necesario para la unión de cadena liviana, está presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena liviana de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se co-transfectan en un organismo anfitrión adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando proporciones no iguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o todas las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales resulta en altos rendimientos o cuando las proporciones no son de significancia particular.

[00179] En una realización de este método, 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 liviana-cadena pesada de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encuentra que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no esperada, como la presencia de una cadena liviana de inmunoglobulina en sólo la mitad de la molécula biespecífica proporcionada para facilitar la vía de separación. Este método se describe en la WO 94/04690. Para detalles

242

adicionales de generar anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh et al, Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

[00180] De acuerdo con otro método, la interface entre un par de moléculas de anticuerpo se pueden construir por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interface comprende por lo menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interface de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptofan). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar para las cadenas laterales grandes se crean en la interface de la segunda molécula de anticuerpo al reemplazar las cadenas laterales de aminoácido largas con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales indeseados tal como homodímeros.

[00181] Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugado". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a la avidina, la otra a la biotina. Tales anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para células de sistema inmune objetivo en células indeseadas (Patente Estadounidense No. 4,676,980), y para el tratamiento de la infección de VIH (WO 91/00360, WO 92/00373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden hacer utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la Patente Estadounidense No. 4,676,980, junto con un número de técnicas de reticulación.

[00182] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de los fragmentos de anticuerpo también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos utilizando ligado químico. Brennan et al, Science, 229: 81 (1985) describe un procedimiento en donde los anticuerpos intactos se dividen proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en la presencia de la arsenita de sodio de agente complejante ditiol para estabilizar ditioles vicinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados luego se convierten a derivados tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB luego se reconvierte en el Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de las enzimas.

[00183] El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH de E. coli, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al, J. Exp. Med. , 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula $F(ab')_2$ de anticuerpo completamente humanizada. Cada fragmento Fab' se secreta separadamente de E. coli y se somete a acoplamiento químico directo in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado es capaz de unir a las células que sobreexpresan el receptor HER2 y células T humanas normales, así como también inicia la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra objetivos de tumor de mama humana.

144

[00184] También se han descrito varias técnicas para elaborar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente del cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligan a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de gen. Los homodímeros de anticuerpo se reducen en la región de bisagra para formar monómeros y luego se reoxidan para formar los heterodímetos de anticuerpo. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología "dianticuerpo" descrita por Hollinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para elaborar los fragmentos biespecíficos de anticuerpo. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) mediante un ligador que es muy corto para permitir la formación de pares entre los dos dominios de la misma cadena. De acuerdo con lo anterior, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan a emparejar con los dominios de complementariedad VL y VH de otro fragmento, formando por lo tanto dos sitios de unión a antígeno. También se ha reportado otra estrategia para elaborar fragmentos biespecíficos de anticuerpo mediante en uso de los dímeros de cadena única Fv (sFv). Ver Gruber et al, J. Immunol, 152:5368 (1994).

[00185] Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al J. Immunol. 147: 60 (1991).

Anticuerpos multivalentes

[00186] Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo bivalente mediante una célula que expresa un antígeno al que une los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptido del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En ciertas realizaciones, el dominio de dimerización comprende (o consiste de) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más terminales amino de sitios de unión a antígeno para la región Fc. En ciertas realizaciones, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste de) tres a aproximadamente ocho sitios de unión a antígeno. En tal una realización, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste de) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende por lo menos una cadena de polipéptido (por ejemplo, dos cadenas de polipéptido), en donde las cadenas de polipéptido comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, las cadenas de polipéptido pueden comprender VDI-(XI)n -VD2-(X2)n -Fc, en donde VDI es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptido de una región Fc, XI y X2 representa un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, las cadenas de polipéptido pueden comprender: VH-CHI –ligador flexible - VH-CHI- cadena de región Fc; o VH-CHI -VH-CHI -Cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente aquí puede comprender adicionalmente por lo menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena liviana. El anticuerpo multivalente aquí, por ejemplo, puede comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena liviana. Los polipéptidos de dominio

variable de cadena liviana contemplados aquí comprenden una dominio de variable de cadena liviana y, opcionalmente, comprende adicionalmente un dominio CL.

Anticuerpos de dominio único

[00187] En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una cadena de polipéptido única que comprende toda o una porción del dominio variable de cadena pesada o todo o una porción del dominio de variable de cadena liviana de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo humano de dominio único (Domantis, Inc., Waltham, MA; ver, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 6,248,516 Bl). En una realización, un anticuerpo de dominio único consiste de todo o una porción del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

Variantes de anticuerpo

[00188] En algunas realizaciones, se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácido de los anticuerpos descritos aquí. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácido del anticuerpo se pueden preparar al introducir cambios apropiados en la secuencia de nucleótido que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis de péptido. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácido del anticuerpo. Se puede hacer cualquier combinación de eliminación, inserción, y sustitución para arribar en la construcción

247

final, dado que el producto final posee las características deseadas. Se pueden introducir alteraciones de aminoácido en la secuencia de aminoácido del anticuerpo objeto al momento que se hace la secuencia.

[00189] Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que prefieren ubicaciones para mutagenia se llama "mutagenia de exploración de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. Aquí, un residuo o grupo de residuos objetivo se identifican (por ejemplo, residuos cargados tal como Arg, Asp, His, Lys, y Glu) y reemplazados por un aminoácido cargado negativamente o neutro (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas ubicaciones de aminoácido demuestran sensibilidad funcional para las sustituciones luego se refinen al introducir adicionalmente u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Así, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácido se predetermina, la naturaleza de la mutación per se no se necesita predeterminar. Por ejemplo, para analizar el desarrollo de una mutación en un sitio dado, exploración ala o mutagenia aleatorizada se conduce en un codón o región objetivo y se detectan las inmunoglobulinas deseadas para la actividad deseada.

[00190] Las inserciones de la secuencia de aminoácido incluyen fusiones de terminal amino- y/o carboxilo que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cientos o más residuos, así como también inserciones intrasecuencia de únicos o múltiples residuos de aminoácido. Ejemplos de inserciones de terminal incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo de terminal N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la

248

fusión al terminal N- o C- del anticuerpo para una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la vida útil del suero del anticuerpo.

[00191] En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención se altera para incrementar o reducir el grado al que se glucosila el anticuerpo. La glucosilación de polipéptidos se liga típicamente a N u O. El ligado a N se refiere a la adhesión de un grupo funcional de carbohidrato para la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X - treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconcimiento para adhesión enzimática del grupo funcional carbohidrato para la cadena lateral asparagina. Así, la presencia de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la adhesión de uno de los azúcares N- aceilgalactosamina, galactosa, o xilosa para un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[00192] La adición o eliminación de los sitios de glucosilación para el anticuerpo se lleva a cabo convenientemente al alterar la secuencia de aminoácido de tal manera que uno o más de las secuencias tripéptido descritas anteriormente (para los sitios de glucosilación ligados a N) se crea o se remueve. La alteración también se puede hacer mediante la adición, eliminación, o sustitución de uno o más residuos serina o treonina para la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

[00193] Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato adherido a este se puede alterar. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido ramificado, bicatenario que se

adhiere generalmente por un ligado N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, por ejemplo, Wright et al. (1997) TIBTECH 15:26-32. El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa, y ácido sialicílico, así como también una fucosa adherida a GlcNAc en la "corriente" de la estructura de oligosacárido bicatenario. En algunas realizaciones, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención se pueden hacer con el fin de crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

[00194] Por ejemplo, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa adherida (directamente o indirectamente) a una región Fc. Tales variantes pueden tener función ADCC mejorada. Ver, por ejemplo, Publicación de Patente Estadounidense Nos. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Ejemplos de publicaciones se relacionan a variantes de anticuerpo "defucosiladas" o "deficientes de fucosa" que incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031 140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane- Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Ejemplos de estirpes celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen Lee 13 células CHO deficientes en fucosilación de proteína (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); US 2003/0157108 Al, Presta, L; y WO 2004/056312 Al, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 1 1), y estirpes celulares transgénicas, tal como gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO transgénicas (ver, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614

(2004); Kanda, Y. et al, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); y WO2003/085107).

[00195] Las variantes de anticuerpo se proporcionan adicionalmente con oligosacáridos divididos, por ejemplo, en los que un oligosacárido bicatenario se adhiere a la región Fc del anticuerpo se divide por GlcNAc. Tales variantes de anticuerpo pueden terne fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Ejemplos de tales variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al); Patente Estadounidense No. 6,602,684 (Umana et al); y US 2005/0123546 (Umana et al). También se proporcionan variantes de anticuerpo con por lo menos un residuo galactosa en el oligosacárido adherido a la región Fc. Tales variantes de anticuerpo pueden tener función CDC mejorada. Se describen tales variantes de anticuerpo, por ejemplo, en WO 1997/30087 (Patel et al); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

[00196] En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácido que mejoran adicionalmente ADCC, por ejemplo, las sustituciones en posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de los residuos). Tales sustituciones pueden ocurrir en combinación con cualquiera de las variaciones descritas anteriormente.

[00197] En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, que hacen a este un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la vida útil del anticuerpo in vivo es importante todavía en ciertas funciones efectoras (tal como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, las actividades Fc del anticuerpo se miden para asegurar que solo se mantienen

las propiedades deseadas. Los ensayos de citotoxicidad in vitro y/o in vivo se pueden conducir para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión del receptor Fc (FcR) se pueden conducir para asegurar que el anticuerpo carece de unión FcγR (por lo tanto probablemente carece de actividad ADCC), pero retiene la capacidad de unión FcRn. Las células principales para mediar células ADCC, NK, expresan solo FcγRIII, aunque los monolitos expresan la expresión de FcγRI, FcγRII y FcγRIII. FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). Ejemplos no limitantes de ensayos in vitro para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describe en la Patente Estadounidense No. 5,500,362 (ver, por ejemplo Hellstrom, I., et al Proc. Nat 7 Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., Proc. Nat 'l Acad. ScL USA 82:1499-1502 (1985); 5,821 ,337 (ver Bruggemann, M. et al, J. Exp. Med. 166: 1351- 1361 (1987)). Alternativamente, se pueden emplear métodos de ensayo no radioactivos (ver, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radioactiva ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas Naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como aquel descrito en Clynes et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión Clq para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unir Clq y carece de actividad CDC. Para evaluar la activación complementaria, se puede desarrollar un ensayo CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Métodos 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al, Blood 101 :1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103:2738- 2743 (2004)).

152

La unión FcRn y depuración in vivo /determinaciones de vida útil también se puede desarrollar utilizando métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

[00198] Se proporcionan otras variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácido. Los sitios de interés para mutagenia de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo en encabezado de "sustituciones preferidas." Se proporcionan cambios más sustanciales, denominados "sustituciones de ejemplo" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente adelante en referencia a las clases de aminoácido. Las sustituciones de aminoácido se pueden introducir en un anticuerpo de interés y los productos se detectan, por ejemplo, para una actividad deseada, tal como unión de antígeno mejorada, inmunogenicidad reducida, ADCC o CDC mejorada, etc.

TABLA 1

Residuo Original	Sustituciones de Ejemplo	Sustituciones preferidas
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

253

Residuo Original	Sustituciones Ejemplo	Sustituciones preferidas
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)	Norleucine; 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

[00199] Las modificaciones en las propiedades biológicas de un anticuerpo se pueden llevar a cabo al seleccionar sustituciones que afectan la estructura de la estructura del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) la masa de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (in A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

154

(1) No polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), He (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polar no cargado: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) acídico: Asp (D), Glu (E)

(4) básico: Lys (K), Arg (R), His(H)

Alternativamente, se pueden dividir residuos de ocurrencia natural en grupos con base en propiedades de cadena lateral común:

(1) hidrófobo: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, He;

(2) hidrófilo neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) acídico: Asp, Glu; (4) basic: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influencian la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

[00200] Las sustituciones no conservadoras requieren el intercambio de un miembro de una de estas clases para otra clase. Tales residuos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustitución conservadora o, en los sitios restantes (por ejemplo, no conservados).

[00201] Un tipo de variantes de sustitución involucra sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo padre (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, las variantes resultantes seleccionadas

para desarrollo adicional habrán modificado (por ejemplo, mejorado) las propiedades biológicas relacionadas al anticuerpo padre de las ellas se generan. Una variante sustitucional de ejemplo es un anticuerpo maduro de afinidad, que se puede genera convenientemente utilizando técnicas de maduración de afinidad con base en exhibición de fago. En resumen, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácido en cada sitio. Los anticuerpos así generados visualizan las partículas de fago filamentosas como fusiones a por lo menos parte de una proteína cubierta de fago (por ejemplo, el producto de gen III de M 13) empacado dentro de cada partícula. Las variantes de exhibición de fago luego se detectan por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Con el fin de identificar los sitios de región hipervariable candidatos para modificación, mutagenia de exploración (por ejemplo, exploración de alanina) se puede desarrollar para identificar residuos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión de antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser benéfico analizar una estructura de cristal del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para sustitución de acuerdo con técnicas conocidas en el arte, que incluyen aquellas elaboradas aquí. Una vez se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a detección utilizando técnicas conocidas en el arte, que incluyen aquellas descritas aquí, y variantes con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se puede seleccionar para desarrollo adicional.

[00202] Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de secuencia de aminoácido del anticuerpo se preparan por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una

fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácido que ocurren naturalmente) o preparación por mutagenia mediada por oligonucleótido (o dirigida a sitio), mutagenia PCR, y mutagenia de casete de una variante preparada más temprano o una versión de no variante del anticuerpo.

[00203] Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácido en una región Fc de anticuerpos de la invención, que genera por lo tanto una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 Fc humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido que incluyen aquellas de una bisagra cisteína.

[00204] De acuerdo con esta descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención puede comprender una o más alteraciones como se compara con el anticuerpo contraparte tipo intacto, por ejemplo, en la región Fc. No obstante estos anticuerpos retendrían sustancialmente las mismas características requeridas para utilización terapéutica cuando se compara con su contraparte tipo intacto. Por ejemplo, se considera que se pueden hacer ciertas alteraciones en la región Fc que resultaría en unión Clq alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en WO99/51642. Ver también Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); Patente Estadounidense No. 5,648,260; Patente Estadounidense No. 5,624,821; y WO94/29351 relacionado don otros ejemplos de variantes de la región Fc. La WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida para los FcR. El

237

contenido de estas publicaciones de patente se incorpora específicamente aquí como referencia. Ver, también, Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con vidas útiles incrementadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable para la transferencia de los IgG maternos al feto (Guyer et al, J. Immunol. 1 17:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et al). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones que mejoran aquí la unión de la región Fc a FcRn. Las variantes de polipéptido con las secuencias de aminoácido de región Fc alterada y capacidad de unión Clq reducida o incrementada se describen en la Patente Estadounidense No. 6, 194,55 IBI, WO99/51642. Los contenidos de aquellas publicaciones de patente se incorporan específicamente aquí como referencia. Ver, también, Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178- 4184 (2000).

[00205] En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la interface de los polipéptidos Fc que comprenden la región Fc, en donde las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido Fc y en una cavidad en un segundo polipéptido Fc, en donde la protuberancia es posicionable en la cavidad para promover la complejación del primer y el segundo polipéptidos Fc. Los métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,731,168.

[00206] En todavía otro aspecto, puede ser deseable crear anticuerpos construidos por ingeniería cisteína, por ejemplo, "tioMAb," en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos cisteína. En realizaciones

particulares, los residuos sustituidos ocurren en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir aquellos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se posicionan por lo tanto en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para conjugar el anticuerpo a otros grupos funcionales, tal como grupos funcionales de fármaco o grupos funcionales de fármaco ligados, como se describe adicionalmente aquí. En ciertas realizaciones, cualquiera uno o más de los siguientes residuos se puede sustituir con cisteína: región Fc V205 (numeración Kabat) de la cadena liviana; Al 18 (Numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (Numeración EU) de la cadena pesada.

Derivados de anticuerpo

[00207] Los anticuerpos de la presente invención se pueden modificar adicionalmente por contener grupos funcionales no proteináceos adicionales que se conocen en la técnica y fácilmente disponibles. Preferiblemente, los grupos funcionales adecuados para la derivación del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, povidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de anhídrido etileno/maleico, poliaminoácidos homopolímeros o copolímeros aleatorizados), y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros propropilenglicol, copolímeros de óxido de etileno/óxido de polipropileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en el agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros adheridos al anticuerpo puede variar, y si se

adhiere más de un polímero, ellos pueden tener las mismas o diferentes moléculas. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para derivación se puede determinar con base en las consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a ser mejorado, si el derivado de anticuerpo se utiliza en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

[00208] En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y grupos funcionales no poteináceos que se puede calentar selectivamente mediante la exposición a la radiación. En una realización, el grupo funcional no proteináceo es un nanotubo de carbono (Kam et al, Proc. Natl. Acad. ScL USA 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, se asesinan las longitudes de onda que no perjudican células ordinarias, pero que calientan el grupo funcional no proteináceo a una temperatura en la que las células próximas al grupo funcional no proteináceo de anticuerpo.

Inmunoconjugados

[00209] La invención también proporciona inmunoconjugados (referido intercambiablemente como "conjugados de fármaco-anticuerpo," o "ADC") que comprende un anticuerpo conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor de crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina de proteína, una toxina enzimáticamente activa de bacterias, hongos, plantas, o de origen animal, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

[00210] Los inmunoconjugados se han utilizado para el suministro local de agentes citotóxicos, es decir, fármacos que asesinan o inhiben el crecimiento o proliferación de células, en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549; Wu et al. (2005) Nature Biotechnology 23(9):1 137-1146; Payne, G. (2003) y 3:207-212; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu- Duvaz y Springer (1997) Adv. Drug Deliv. Rev. 26:151-172; U.S. Pat. No. 4,975,278). Los inmunoconjugados permiten el suministro objetivado de un grupo funcional de fármaco para un tumor, y acumulación intracelular aquí, en donde la administración sistémica de fármacos no conjugados puede resultar en niveles inaceptables de toxicidad a células normales así como también las células de tumor que se busca eliminar (Baldwin et ah, Lancet (Mar. 15, 1986) pp. 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications (A. Pinchera et ah, eds) pp. 475-506. Ambos anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales se han reportados como útiles en estas estrategias (Rowland et ah, (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87). Los fármacos utilizados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland et al, (1986) supra). Las toxinas utilizadas en los conjugados de toxina-anticuerpo incluyen toxinas bacterianas tal como toxina difteria, toxinas de planta tal como ricina, toxinas de molécula pequeña tal como geldanamicina (Mandler et al (2000) J Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu et ah, (1996) Proc. Natl. Acad. ScL USA 93:8618-8623), y caliqueamicina (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos mediante mecanismos que incluyen unión a unión de tubulina, de ADN, o

261

inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienen a ser inactivos o menos activos cuando se conjuga a anticuerpos grandes o ligandos del receptor de proteína.

[00211] El ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo- radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 de murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos B malignos y normales y 111 en radioisótopo o 9OY unido en un ligador-quelador de tiourea (Wiseman et al (2000) Eur. Jour. Nuch Med. 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Aunque el ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no Hodgkin de célula B (NHL), la administración resulta en citopenas prolongadas y severas en la mayoría de pacientes. MYLOT ARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de fármaco-anticuerpo compuesto de un anticuerpo huCD33 ligado a caliqueamicina, se mejora en el 2000 para el tratamiento de la leucemia linfoide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; Patente Estadounidense Nos. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 57391 16; 5767285; 5773001). El Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo huC242 ligado por vía de un enlace de disulfuro SPP al grupo funcional de fármaco maitansinoide, el DMI, se aventaja en ensayos de Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tal como cáncer de colon, pancreático, gástrico, y otros cánceres. El MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del antígeno de membrana específico anti-próstata (PSMA) anticuerpo monoclonal ligado al grupo funcional de fármaco maitansinoide, el DMI, está bajo desarrollo para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Los péptidos

auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugan a anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específico para Lewis Y en carcinomas) y cACIO (específico para CD30 en malignidades hematológicas) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnol. 21(7):778-784) y están bajo desarrollo terapéutico.

[00212] En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen aquí (por ejemplo, anteriormente). Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden utilizar incluyen cadena difteria A, fragmentos activos sin unión de toxina difteria, cadena exotoxina A (de Pseudomonas aeruginosa), cadena ricina A, cadena abrina A, cadena modeccina A, alfa- sarcina, proteínas Aleurites fordii, proteínas diantina, proteínas Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Ver, por ejemplo, WO 93/21232 publicada en Octubre 28, 1993. Una variedad de radionúclidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, y ^{186}Re. Se hacen conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico utilizando una variedad de agentes de acoplamiento a proteína bifuncionales tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tal como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos bis- flúor activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-

dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina ricina se puede preparar como se describe en Vitetta et al, Science, 238: 1098 (1987). El ácido de carbono 14-marcado 1 -isotiocianatobencil- 3-metildietileno triaminapentaacético (MX-DTPA) es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de radionucleótido para el anticuerpo. Ver WO94/11026.

[00213] Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tal como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno, y CC 1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan aquí.

Maitansina y maitansinoides

[00214] En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) conjugado a una o más moléculas maitansinoides.

[00215] Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan al inhibir la polimerización de tubulina. La maitansina primero se aísla del arbusto Maytenus serrata del oriente de África (Patente Estadounidense No. 3,896,11 1). Posteriormente, se descubre que ciertos microbios también producen maitansinoides, tal como maitansinol y ésteres maitansinol C-3 (Patente Estadounidense No. 4,151,042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se describen, por ejemplo, en Patente Estadounidense Nos. 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.

264

[00216] Los grupos funcionales de fármaco Maitansinoide son grupos funcionales de fármaco atractivos en conjugados de fármaco de anticuerpo debido a que ellos son: (i) relativamente accesibles para preparar mediante fermentación o modificación química, derivación de productos de fermentación, (ii) agradable para derivación con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de ligadores sin disulfuro para los anticuerpos, (iii) estable en plasma, y (iv) efectivo contra una variedad de estirpes celulares de tumor.

[00217] Se describen inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos para elaborar los mismos, y su uso terapéutico, por ejemplo, en la Patente Estadounidense Nos. 5,208,020, 5,416,064 y Patente Europea EP 0 425 235 BI, cuyas descripciones se incorporan expresamente aquí como referencia. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describe inmunoconjugados que comprenden un ligado DMI designado maitansinoides para el anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorectal humano. El conjugado se encuentra que es altamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas, y muestran actividad antitumor en un ensayo de crecimiento de tumor in vivo. Chari et al, Cancer Research 52:127-131 (1992) describe inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjuga por vía de un ligador disulfuro para el anticuerpo de murino A7 unido a un antígeno en estirpes celulares de cáncer de colon humano, o con otro anticuerpo monoclonal de murino TA.1 que une el oncogen HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1 -maitansinoide se prueba in vitro en la estirpe celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa antígenos de superficie 3 x 105 HER-2 por célula. El conjugado de fármaco alcanza un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que se podría incrementar al incrementar el número de moléculas maitansinoides

por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide muestran baja citotoxicidad sistémica en ratones.

[00218] Se preparan conjugados maitansinoides de anticuerpo al ligar químicamente un anticuerpo a una molécula maitansinoide sin disminuir significaqtivamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula maitansinoide. Ver, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,208,020 (cuya descripción se incorpora expresamente aquí como referencia). Un promedio de 3-4 moléculas maitansinoides conjugados por la molécula de anticuerpo tiene eficacia mostrada en mejorar la citotoxicidad de células objetivo sin afectar negativamente la función o solubilidad del anticuerpo, aunque aún una molécula de toxina/anticuerpo se esperaría que mejorara la citotoxicidad sobre el uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o se aíslan de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 5,208,020 y en otras patentes y publicaciones de no patente referidas aquí anteriormente. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula maitansinol, tal como varios ésteres maitansinol.

[00219] Existen muchos grupos ligados conocidos en la técnica para elaborar con jugados de anticuerpo-maitansinoide, que incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en la Patente Estadounidense No. 5,208,020 o Patente EP 0 425 235 B1, Chari et al, Cancer Research 52: 127-131 (1992), y Solicitud de Patente Estadounidense No. 10/960,602, presentada Oct. 8, 2004, cuyas descripciones se incorporan expresamente aquí como referencia. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprende el componente ligador SMCC se pueden preparar

como se describe en la Solicitud de Patente Estadounidense No. 10/960,602, presentado en Oct. 8, 2004. Los grupos de ligado incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles de ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles peptidasa, o grupos lábiles esterasa, como se describe en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferidos los grupos de disulfuro y tioéter. Se describen grupos de ligado adicionales y se ejemplifican aquí.

[00220] Los conjugados del anticuerpo y maitansinoide se pueden hacer utilizando utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano- 1 -carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tal como suberato disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p- azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tal como bis-(p- diazoniumbenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6- diisocianato), y compuestos bis-flúor activo (tal como 1 ,5-difluoro-2,4- dinitrobenceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2- piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson et al, Biochem. J. 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un ligado de disulfuro.

[00221] El ligador se puede adherir a la molécula maitansinoide en varias posiciones, dependiente del tipo del enlace. Por ejemplo, un ligado éster se puede formar mediante reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede ocurrir en la posición C-3 que tiene 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 tiene un grupo

287

hidroxilo. En una realización preferida, el ligado se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo maitansinol.

Auristatinas y dolastatinas

[00222] En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a las dolastatinas o análogos o derivados peptídicos dolostatina, las auristatinas (Patente Estadounidense Nos. 5,635,483; 5,780,588). Se ha mostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con dinámicos de microtúbulo, hidrólisis GTP, y división celular y nuclear (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents y Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad antineoplásico (Patente Estadounidense No. 5,663,149) y actividad antifúngica (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El grupo funcional de fármaco dolastatina o auristatina se puede adherir al anticuerpo a través del terminal N (amino) o el terminal C (carboxilo) del grupo funcional de fármaco peptídico (WO 02/088172).

[00223] Realizaciones de auristateno de ejemplo incluyen los grupos funcionales monometilauristatina ligados al Terminal N DE y DF, se describe en "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," U.S. Ser. No. 10/983,340, presentada en Nov. 5, 2004, cuya descripción se incorpora expresamente aquí como referencia en su totalidad.

[00224] Típicamente, se pueden preparar grupos funcionales de fármaco con base en péptido al formar un enlace de péptido entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Se pueden preparar tales enlaces de péptido, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (ver E. Schroder y K. Lubke,

"The Peptides," volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptido. Los grupos funcionales de fármaco auristatina/dolastatina se pueden preparar de acuerdo con los métodos de: US 5,635,483; US 5,780,588; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 1 1 1 :5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; y Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863. Ver también Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784; "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," US Ser. No. 10/983,340, presentado en Nov. 5, 2004, incorporado expresamente aquí como referencia en su totalidad (que describe, por ejemplo, ligadores y métodos para preparar compuestos monometilvalina tal como MMAE y MMAF conjugado a los ligdores).

Caliqueamicina

[00225] En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de Caliqueamicina. La familia Caliqueamicina de antibióticos es capaz de producir rupturas de ADN bicatenarios en concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de los conjugados de la familia Caliqueamicina, ver Patente Estadounidense Nos. 5,712,374, 5,714,586, 5,739,1 16, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (para toda la Compañía Cianamida Americana). Los análogos estructurales de Caliqueamicina que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, γII, α2I, α3I, N-acetil-γII, PSAG y θI1 (Hinman et al, Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las Patentes Estadounidenses mencionadas anteriormente para la Cianamida Americana). Otro fármaco anti-tumor que el anticuerpo puede conjugar es QFA que es un antifolato. La

269

Caliqueamicina y QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruza fácilmente la membrana de plasma. Por lo tanto, la retoma celular de estos agentes a través del anticuerpo media la internalización que mejora mayormente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

[00226] Otros agentes antitumor que se pueden conjugar con los anticuerpos incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocen colectivamente el complejo LL-E33288 descrito en la Patente Estadounidense Nos. 5,053,394, 5,770,710, así como también esperamicinas (Patente Estadounidense No. 5,877,296).

[00227] Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden utilizar incluyen cadena difteria A, fragmentos activos sin unión de toxina difteria, cadena exotoxina A (de Pseudomonas aeruginosa), cadena ricina A, cadena abrina A, cadena modeccina A, alfa-sarcina, proteínas Aleurites fordii, proteínas diantina, proteínas Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Ver, por ejemplo, WO 93/21232 publicado en Octubre 28, 1993.

[00228] La presente invención contempla adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una deoxiribonucleasa; DNasa).

[00229] Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Está disponible una variedad de isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen At^{211}, 1^{131}, 1^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se utiliza el conjugado para detección, este puede comprender un átomo radioactivo para estudios cintigráficos, por ejemplo tc99m o 1123, o una marca de giro para formación de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocido como formación de resonancia magnética, mri), tal como yodo- 123 de nuevo, yodo-131, indio-1,1,1, flúor-19, carbon-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[00230] Las radio- u otras marcas se pueden incorporar en el conjugado en formas conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante síntesis de aminoácido químico utilizando precursores de aminoácidos adecuados que involucran, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Las marcas tal como tc^{99} o I^{123}, Re^{186}, Re^{188} y In^{111} se pueden adherir por vía de un residuo cisteína en el péptido. Se puede adherir itrio-90 por vía de un residuo lisina. El método IODOGEN (Fraker et al (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 en detalle.

[00231] Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se pueden hacer utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tal como N-succinimidil-3-(2- piridilditio) propionato (SPDP), succinirnidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano- 1 -carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tal como suberato disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído),

compuestos bis-azido (tal como bis (p- azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tal como bis-(p- diazoniumbenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6- diisocianato), y compuestos bis-flúor activo (tal como 1,5-difluoro-2,4- dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede prepara una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al, Science 238:1098 (1987). El ácido Carbon- 14-marca 1-isotiocianatobenci-3- metildietileno triaminapentaacético (MX-DTPA) es un agente quelante de ejemplo para la conjugación del radionucleótido para el anticuerpo. Ver WO94/11026. El ligador puede ser un "ligador dividible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un ligador lábil de ácido, ligador sensible a peptidasa, ligador fotolábil, ligador dimetilo o ligador que contiene disulfuro (Chari et al, Cancer Research 52:127- 131 (1992); Patente Estadounidense No. 5,208,020).

[00232] Los compuestos contemplan expresamente, pero no se limitan a, ADC preparado con reactivos reticulados: 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 (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Ver páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook y Catálogo.

Preparación de conjugados de fármaco de anticuerpo

[00233] En los conjugados de fármaco de anticuerpo (ADC), un anticuerpo (Ab) se conjuga con uno o más grupos funcionales de fármaco (D), por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 grupos funcionales de fármaco por anticuerpo, a través de un ligador (L). El ADC de Fórmula I se puede preparar

272

mediante varias rutas, empleando reacciones de química orgánica, condiciones, y reactivos conocidos por aquellos expertos en la técnica, que incluye: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo ligador bivalente, para formar Ab-L, por vía de un enlace covalente, seguido por reacción con un grupo funcional del fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un grupo funcional de fármaco con un reactivo ligador bivalente, para formar D-L, por vía de un enlace covalente, seguido por reacción con el grupo nucleófilo seguido por reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Los métodos adicionales para preparar ADC se describen aquí.

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad I$$

[00234] El ligador se puede componer de uno o más componentes ligadores. Los componentes ligadores de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxicarbonilo ("PAB"), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC"), y N-Succinimidilo (4-iodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"): los componentes de ligador adicionales se conocen en la técnica y algunos se describen aquí. Ver también "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," US Ser. No. 10/983,340, presentado en Nov. 5, 2004, cuyos contenidos se incorporan expresamente aquí como referencia en su totalidad.

[00235] En algunas realizaciones, el ligador puede comprender residuos de aminoácido. Los componentes ligadores de aminoácido de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Dipéptidos de ejemplo incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe).

Tripéptidos de ejemplo incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly)- Los residuos de aminoácido que comprenden un componente ligador de aminoácido incluyen aquellos de ocurrencia natural, así como también aminoácidos menores y análogos de aminoácido de ocurrencia no natural, tal como citrulina. Los componentes de ligador de aminoácido se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para división enzimática mediante una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

[00236] Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina de Terminal N, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxi 1 o amino de azúcar en donde se glucosila el anticuerpo. Los grupos amina, tiol, y hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en grupos funcionales ligadores y reactivos de ligador que incluyen: (i) ésteres activos tal como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos, y haluros ácidos; (ii) haluros alquilo y bencilo tal como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo, y grupos maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercadena reducible, es decir puentes cisteína. Se pueden hacer anticuerpos reactivos para conjugación con reactivos ligadores mediante tratamiento con un agente de reducción tal como DTT (ditiotreitol). Cada puente de cisteína formará así, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Los grupos nucleófilos adicionales se pueden introducir en anticuerpos a través de la reacción e lisinas con 2-iminotiolano (reactivos de Traut) que resulta en la conversión con una amina en un tiol. Se pueden introducir grupos tiol reactivos en el anticuerpo (o fragmento del mismo) al introducir uno, dos, tres, cuatro, o más

residuos cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos cisteína no nativos de aminoácido).

[00237] Los conjugados de fármaco de anticuerpo también se pueden producir mediante la modificación del anticuerpo para introducir grupos funcionales electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo o fármaco ligador. Los azúcares de anticuerpos glusocilados se pueden oxidar, por ejemplo con reactivos de oxidación de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos ligadores o grupos funcionales de fármaco. Los grupos base Schiff imina resultantes forman un ligado estable, o se pueden reducir, por ejemplo, mediante reactivos borohidruro para formar ligados de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato de sodio puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que puede reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen residuos treonina o serina de terminal N pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, resultando en la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5,362,852). Tales aldehídos pueden reaccionar con un grupo funcional de fármaco o nucleófilo ligador.

[00238] De forma similar, los grupos nucleófilos en un grupo funcional de fármaco incluyen, pero no se limitan a: amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato, y grupos arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en grupos funcionales ligadores y reactivos ligadores que incluyen: (i) ésteres activos tal

como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos, y haluros ácidos; (ii) haluros alquilo y bencilo tal como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo, y grupos maleimida.

[00239] Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico se puede hacer, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptido. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado adyacente uno al otro o separado por una región que codifica un péptido ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[00240] En todavía otra realización, el anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (tal como estreptavidina) para el uso en tumor pre-objetivo en donde el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, luego de la remoción del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente de depuración y luego de la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga en un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Ciertos Métodos para Elaborar Anticuerpos

Ciertos Métodos con base en hibridoma

[00241] Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden hacer utilizando el método de hibridoma descrito primero por Kohler et al, Nature, 256:495 (1975), y se describe adicionalmente, por ejemplo, en Hongo et al, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al, Anticuerpos: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al. , in: Monoclonal

Anticuerpos and T-Cell Hybridomas 563- 681 (Elsevier, N.Y., 1981), y Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) con respecto a hibridomas humano-humano. Los métodos adicionales incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 7,189,826 con respecto a la producción de anticuerpos IgM naturales humanos monoclonales de estirpes celulares de hibridoma. La tecnología de hibridoma humana (tecnología Trioma) se describe en Vollmers y Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3): 185-91 (2005).

[00242] Para varias otras técnicas de hibridoma, ver, por ejemplo, US 2006/258841; US 2006/183887 (anticuerpos completamente humanos), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; y Patente Estadounidense Nos. 7,078,492 y 7,153,507. Un protocolo de ejemplo para producir anticuerpos monoclonales utilizando el método de hibridoma se describe como sigue. En una realización, un ratón u otro animal anfitrión apropiado, tal como un hámster, se inmuniza para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que unirán específicamente a la proteína utilizada para inmunización. Se elevan anticuerpos en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de un polipéptido que comprende VEGF o un fragmento del mismo, y un adyuvante, tal como lípido monofosforilo A (MPL)/trehalosa dicrinomicolato (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT). Un polipéptido que comprende VEGF o un fragmento del mismo se pueden preparar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tal como métodos recombinantes, algunos de los cuales se describen adicionalmente aquí. El suero de animales inmunizados se evalúa para anticuerpos anti-VEGF, y las inmunizaciones inoculadas se administran

opcionalmente. Se aíslan linfocitos de animales que producen anticuerpos anti-VEGF. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro.

[00243] Los linfocitos luego se fusionan con células mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Ver, por ejemplo, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles y Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986). Se pueden utilizar células de mieloma que fusionan eficientemente, suportan establemente la producción de alto nivel del anticuerpo mediante las células que producen anticuerpos seleccionados, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las células mieloma de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, lineas de mieloma de murino, tal como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-1 1 disponibles de the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Las estirpes celulares heteromieloma de ratón-humano y mieloma de humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[00244] Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se hacen crecer en medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células mieloma parentales carecen de la enzima transferasa fosforibosilo guanina hipoxantina (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirán hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT. Preferiblemente, se utilizan métodos de cultivo de célula hibridoma libre

de suero para reducir el uso de suero derivado de animal tal como suero bovino fetal, como se describe, por ejemplo, en Even et al., Trends in Biotechnology, 24(3), 105- 108 (2006).

[00245] Los oligopéptidos como herramientas para mejorar la productividad de los cultivos celulares de hibridoma se describen en Franek, Trends in Monoclonal Antibody Research, 11 1- 122 (2005). Específicamente, los medios de cultivo estándar se enriquecen con ciertos aminoácidos (alanina, serina, asparagina, prolina), o con fracciones de hidrolizato de proteína, y se puede suprimir significativamente la apoptosis mediante oligopéptidos sintéticos, constituidos de tres a seis residuos de aminoácido. Los péptidos están presentes en concentraciones milimolares o mayores.

[00246] El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se hacen crecer se puede evaluar para la producción de anticuerpos monoclonales que unen a VEGF. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producido por células de hibridoma se puede determinar mediante inmunosupresión o mediante un ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis Scatchard. Ver, por ejemplo, Munson et al, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

[00247] Después que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividad deseada, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de limitación subclonados y se hacen crecer mediante métodos estándar. Ver, por ejemplo, Goding, supra. El medio de cultivo adecuado para este propósito incluye, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-

2+8

1640. Adicionalmente, las células de hibridoma se pueden hacer crecer in vivo como tumores ascitas en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascitas, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tal como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. Un procedimiento para el aislamiento de las proteínas de células de hibridoma se describe en US 2005/176122 y Patente Estadounidense No. 6,919,436. El método incluye utilizar sales mínimas, tal como sales liotrópicas, en los procesos de unión y preferiblemente utilizando también cantidades pequeñas de disolventes orgánicos en el proceso de elución.

Ciertos Métodos de Detección de Colección

[00248] Los anticuerpos de la invención se pueden hacer al utilizar colecciones combinatorias para la detección de anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen en la técnica una variedad de métodos para generar colecciones de exhibición de fago y detectar tales colecciones para anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Tales métodos se describen generalmente en Hoogenboom et al in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). Por ejemplo, un método para generar anticuerpos es interés es a través del uso de una colección de anticuerpo de fago como se describe en Lee et al, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93.

[00249] En principio, se seleccionan clones de anticuerpo sintéticos mediante la detección de colección de fago que exhiben varios fragmentos de la región

variable de anticuerpo (Fv) fusionados a la proteína cubierta de fago. Tales colecciones de fago se filtran mediante cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los fragmentos Fv que expresan clones capaces de unir al antígeno deseado se adsorben con el antígeno y así se separan de los clones sin unión en la colección. Los clones de unión luego se eluyen del antígeno, y se pueden enriquecer adicionalmente mediante ciclos adicionales de adsorción/elusión de antígeno. Cualquiera de los anticuerpos de la invención se pueden obtener al diseñar un procedimiento de detección de antígeno adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido por la construcción del clon de anticuerpo de longitud completa utilizando las secuencias Fv del clon de fago de interés y las secuencias de región constante adecuadas (Fc) descritas en Kabat et al. , Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91 -3242, Bethesda MD (1991), vols. 1 -3.

[00250] En ciertas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada uno de las cadenas liviana (VL) y pesada (VH), que presentan tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden exhibir funcionalmente en fago, como fragmentos Fv de cadena única (scFv), en los que VH y VL se ligan covalentemente a través de un péptido flexible, corto, o como fragmentos Fab, en los que ellos cada uno se fusionan en un dominio constante y no interactúan covalentemente, como se describe en Winter et al., Ann. Rev. Immunol, 12: 433-455 (1994). Como se utiliza aquí, el scFv que codifica los clones de fago y Fab que codifica los clones de fago se refieren colectivamente a "clones de fago Fv " o "clones Fv."

J 80

[00251] Los repertorios de genes VH y VL se pueden clonar separadamente mediante reacción de cadena polimerasa (PCR) y se recombina aleatoriamente en colecciones de fago, que luego se pueden buscar para clones de unión a antígeno como se describe en Winter et al., Ann. Rev. Immunol, 12: 433-455 (1994). Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin el requerimiento de construcción de hibridomas. Alternativamente, el repertorio neófito se puede clonar para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos en un amplio rango de autoantígenos y también no autoantígenos sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths et al, EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las colecciones neófito también se pueden hacer sintéticamente al clonar segmentos de gen V no dispuestos de células madre, y utilizando cebadores PCR que contienen secuencia aleatorizada para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para llevar a cabo la redisposición in vitro como se describe por Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol, 227: 381-388 (1992).

[00252] En ciertas realizaciones, se utiliza fago filamentoso para exhibir los fragmentos de anticuerpo mediante fusión en el glóbulo de proteína cubierto menor. Se pueden exhibir fragmentos de anticuerpo como fragmentos Fv de cadena única, en los que se conectan los dominios VH y VL en la misma cadena de polipéptido mediante un espaciador de polipéptido flexible, por ejemplo, como se describe por Marks et al., J. Mol. Biol, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que se fusiona una cadena a píldora y el otro se secreta en el periplasma de célula anfitriona bacteriana en donde el ensamble de una estructura de proteína cubierta Fab que llega a exhibir en la superficie de fago al desplazar algunas de las proteínas cubiertas tipo intacto, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom et al, Nucl Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

181

[00253] En general, los ácidos nucleicos que codifican los fragmentos de gen de anticuerpo se obtienen de células inmunes cosechadas de humanos o animales. Si se desea que una colección basada a favor de clones anti-VEGF, el sujeto se inmuniza con VEGF para generar una respuesta de anticuerpo, y las células de bazo y/o células B circulantes diferentes a los linfocitos de sangre periférica (PBL) se recuperan para la construcción de librería. En una realización preferida, una colección de fragmento de gen de anticuerpo humano basada a favor de clones anti-VEGF se obtiene al generar una respuesta de anticuerpo anti-VEGF en ratones transgénicos que llevan una disposición de gen de inmunoglobulina humana funcional (y carecen de un sistema de producción de anticuerpo endógeno funcional) de tal manera que la inmunización VEGF eleva a las células B produciendo anticuerpos humanos contra VEGF. La generación de ratones transgénicos que producen el anticuerpo humano se describe adelante.

[00254] El enriquecimiento adicional para poblaciones de célula reactiva anti-VEGF se puede obtener al utilizar un procedimiento de detección adecuado para aislar células B que expresan anticuerpo unido a membrana específica VEGF, por ejemplo, mediante separación celular utilizando cromatografía de afinidad VEGF o adsorción de células para el VEGF marcado fluorocromo seguido por clasificación de células activadas (FACS).

[00255] Alternativamente, el uso de células de bazo y/o células B u otros PBL de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del repertorio de anticuerpo posible, y también permite la construcción de una colección de anticuerpo utilizando cualquier especie animal (humano o no humano) en los que el VEGF no es antigénico. Para colecciones que incorporan la construcción de gen

182

de anticuerpo in vitro, se cosechan células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican los segmentos de gen de anticuerpo no dispuestos. Las células inmunes de interés se pueden obtener de una variedad de especies animales, tal como humano, ratón, rata, lagomorfa, luprino, canino, felino, porcino, bovino, equino, y especies aviares, etc.

[00256] El ácido nucleico que codifica los segmentos de gen variable de anticuerpo (incluyendo segmentos VH y VL) se recuperan de las células de interés y se amplifican. En el caso de las colecciones de gen VH y VL predispuestas, el ADN deseado se puede obtener al aislar el ADN genómico o mARN de los linfocitos luego de la reacción de la cadena polimerasa (PCR) con cebadores de emparejamiento los extremos 5' y 3' de genes VH y VL redispuestos como se describe en Orlandi et al, Proc. Natl. Acad. ScL (U.S.A), 86: 3833-3837 (1989), elaborar por lo tanto repertorios de gen V diversos para expresión. Los genes V se pueden amplificar de cADN y ADN genómico, con cebadores de respaldo en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores delanteros basados dentro del segmento J como se describe en Orlandi et al (1989) y en Ward et al, Nature, 341 : 544-546 (1989). Sin embargo, para la amplificación del cADN, los cebadores de respaldo también se pueden basar en el exón líder como se describe en Jones et al, Biotechnol, 9: 88-89 (1991), y cebadores delanteros dentro de la región constante como se describe en Sastry et al., Proc. Natl. Acad. ScL (U.S.A), 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar degeneración en los cebadores como se describe en Orlandi et al. (1989) o Sastry et al. (1989). En ciertas realizaciones, se maximiza la diversidad de la colección al utilizar cebadores PCR objetivados en cada familia del gen V con el fin de amplificar todas las disposiciones VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de célula inmune, por ejemplo como se

describe en el método de Marks et al., J. Mol. Biol, 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum et al, Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN ejemplificado en los vectores de expresión, se pueden introducir sitios de restricción raros dentro del cebador PCR como una etiqueta en un extremo como se describe en Orlandi et al (1989), o mediante amplificación PCR adicional con un cebador etiquetado como se describe en Clackson et al, Nature, 352: 624-628 (1991).

[00257] Los repertorios de genes V sintéticamente redispuestos se pueden derivar in vitro de segmentos de gen V. La mayor parte de los segmentos de gen VH humano se han clonado y secuenciado (reportado en Tomlinson et al, J. Mol Biol, 227: 776-798 (1992)), y se mapean (reportado en Matsuda et al, Nature Genet., 3: 88-94 (1993); estos segmentos clonados (que incluyen toda la mayoría de conformaciones de bucle H1 y H2) se puede utilizar para generar diversos repertorios de gen VH con cebadores PCR que codifican H3 bucles de diversa secuencia y longitud como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol, 227: 381-388 (1992). Los repertorios VH también se pueden hacer con toda la diversidad de secuencia en un bucle H3 largo de una única longitud como se describe en Barbas et al, Proc. Natl. Acad. ScL U.S.A, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos VK y Vλ clonados se han clonado y secuenciado (reportado en Williams y Winter, Eur. J. Immunol, 23: 1456- 1461 (1993)) y se puede utilizar para elaborar repertorios de cadena liviana sintética. Los repertorios de gen V sintético, con base en un rango de VH y VL veces, y longitudes L3 y H3, codificará los anticuerpos de diversidad estructural considerable. Luego de la amplificación del gen V que codifica ADN, se pueden redisponer segmentos de gen V de línea germinal in vitro de acuerdo con los métodos de Hoogenboom y Winter, J Mol. Biol, 227: 381-388 (1992).

[00258] Los repertorios de los fragmentos de anticuerpo se pueden construir al combinar repertorios de gen VH y VL juntos en varias formas. Cada repertorio se puede crear en diferentes vectores, y los vectores se recombinan in vitro, por ejemplo, como se describe en Hogrefe et al, Gene, 128: 1 19-126 (1993), o in vivo mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse et al, Nucl Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). El alcance de recombinación in vivo explotan la naturaleza de dos cadenas de fragmentos Fab para superar el límite en el tamaño de la colección impuesto por eficiencia en la transformación de E. coli. Los repertorios neófitos VH y VL se clonan separadamente, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. Las dos colecciones luego se combinan mediante infección de fago en bacterias que contienen fagémido de tal manera que la célula contiene diferente combinación y el tamaño de la colección se limita solo por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación in vivo de tal manera que los genes VH y VL se recombinan en un único replicón y se coempaca en viriones de fago. Estas colecciones proporcionan grandes cantidades de diversos anticuerpos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

[00259] Alternativamente, se pueden clonar secuencialmente repertorios en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 88: 7978- 7982 (1991), o se ensambla juntos por PCR y luego clonar, por ejemplo como se describe en Clackson et al, Nature, 352: 624-628 (1991). También se puede utilizar ensamble PCR para unir los ADN VH y VL con ADN que codifica un espaciador de péptido flexible para formar repertorios Fv de cadena única (scFv). En todavía otra técnica, "el ensamble PCR en células" se utiliza para

combinar genes VH y VL con linfocitos por PCR y luego clonar los repertorios de genes ligados como se describe en Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

[00260] Los anticuerpos producidos por colecciones neófito (natural o sintético) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M^{-1}), pero la maduración de afinidad también se puede imitar in vitro al construir y deseleccionar de colecciones secundarias como se describe en Winter et al. (1994), supra. Por ejemplo, se puede introducir la mutación aleatorizada in vitro al utilizar polimerasa propensa a error (reportado en Leung et al, Technique, 1: 11-15 (1989)) en el método of Hawkins et al, J. Mol Biol, 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram et al , Proc. Natl Acad. Sci U.S.A, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, se puede desarrolar maduración de afinidad al mutar aleatoriamente uno o más CDR, por ejemplo, utilizando PCR con cebadores que llevan la secuencia aleatoria que abarca el CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y detección para clones de alta afinidad. La WO 9607754 (publicada el 14 Marzo 1996) describe un método para inducir mutagenia en una región determinante de complementariedad de una cadena liviana de inmunoglobulina para crear una colección de genes de cadena liviana. Otro alcance efectivo es recombinar los dominios VH o VL seleccionados mediante exhibición de fago con repertorios de variantes de dominio V de ocurrencia natural obtenidos de donantes no inmunizados y detección de alta afinidad en varias rondas de mezcla de cadena como se describe en Marks et al, Biotechnol, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades de aproximadamente 10^{-9} M o menos.

[00261] La detección de las colecciones se puede llevar a cabo mediante varias técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, se puede utilizar VEGF para cubrir los pozos de placas de adsorción, expresado en células anfitrionas fijas a las placas de adsorción o utilizado en clasificación celular, o conjugado con biotina para capturar con glóbulos cubiertos con estreptavidina, o se utiliza en cualquier otro método para colecciones de exhibición de fago de tamizado.

[00262] Se pone en contacto muestras de colecciones de fago con VEGF inmovilizado bajo condiciones adecuadas para unir por lo menos una porción de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo pH, resistencia iónica, temperatura y similares se selecciona para imitar condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a las fase sólida se lavan y luego se eluyen mediante ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas et al, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A, 88: 7978-7982 (1991), o mediante álcali, por ejemplo, como se describe en Marks et al, J. Mol Biol, 222: 581-597 (1991), o mediante competición de antígeno VEGF, por ejemplo, en un procedimiento similar al método de competición de antígeno de Clackson et al, Nature, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer 20-1, 000-veces en una ronda única de selección. Más aún, los fagos enriquecidos se pueden hacer crecer en cultivo bacteriano y se someten a rondas adicionales de selección.

[00263] La eficiencia de selección depende de muchos factores, que incluyen las cinéticas de disociación durante el lavado, y si los múltiples fragmentos de anticuerpo en un único fago se pueden acoplar simultáneamente con antígeno. Los anticuerpos con cinéticas de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) can se pueden retener mediante el uso de lavados cortos, exhibición de fago multivalente y densidad de alto recubrimiento de antígeno en fase sólida. La alta

densidad no solo estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, pero favorece la reunión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinéticas de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) se puede promover mediante el uso de lavados largos y exhibición de fago monovalente como se describe en Bass et al, Proteins, 8: 309- 314 (1990) y en WO 92/09690, y una densidad de cubrimiento bajo de antígeno como se describe en Marks et al, Biotechnol, 10: 779-783 (1992).

[00264] Es posible seleccionar entre anticuerpos de fago de diferentes afinidades, aún con afinidades que difieren ligeramente, para VEGF. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionar (por ejemplo, cómo se desarrolla en algunas técnicas de maduración de afinidad) fácilmente hace surgir muchos mutantes, la mayoría unen al antígeno, y unos pocos con alta afinidad. Con VEGF limitante, el fago de alta afinidad se puede complementar. Para retener todos los mutantes de mayor afinidad, se pueden incubar fagos con VEGF biotinilado en exceso, pero con el VEGF biotinilado en una concentración de baja molaridad que la constante de afinidad molar objetivo para VEGF. Luego se pueden capturar fagos de unión de alta afinidad mediante glóbulos paramagnéticos cubiertos con estreptavidina. Ta! "captura de equilibrio" permite a los anticuerpos ser seleccionados de acuerdo con sus afinidades de unión, con sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con tan poco como dos veces mayor afinidad de un gran exceso de fagos con baja afinidad. Las condiciones utilizadas en fagos de lavado vinculado a una fase sólida también se pueden manipular para discriminar en la base de las cinéticas de disociación.

[00265] Se pueden seleccionar clones anti-VEGF con base en la actividad. En ciertas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos anti-VEGF que unen a

células vivas que expresan naturalmente VEGF. En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-VEGF que bloquean la unión entre un ligando VEGF y VEGF, pero no bloquea la unión entre un ligando VEGF y una segunda proteína. Los clones Fv que corresponden a tales anticuerpos anti-VEGF se pueden seleccionar mediante (1) aislamiento de clones anti-VEGF de una colección de fago como se describió anteriormente, y amplificar opcionalmente la población aislada de clones de fago al hacer crecer la población en un anfitrión bacteriano adecuado; (2) seleccionar VEGF y si se desea una segunda proteína contra la cual bloquea y no bloquea la actividad, respectivamente; (3) adsorber los clones de fago anti-VEGF para inmovilizar VEGF; (4) utilizando un exceso de la segunda proteína para eluar cualesquier clones indeseados que reconocen los determinantes de unión VEGF que se sobrepone o comparte con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluir los clones que permanecen adsorbidos en la siguiente etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades bloqueantes/no bloqueantes deseadas se pueden enriquecer adicionalmente al repetir los procedimientos de selección descritos aquí una o más veces.

[00266] Los anticuerpos monoclonales derivados de de hibridoma que codifica el ADN o clones Fv de exhibición de fago de la invención se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, al utilizar cebadores de oligonucleótido diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de cadena liviana y pesada de interés de la plantilla de ADN de fago o hibridoma). Una vez aislado, el ADN se puede colar en los vectores de expresión, que luego se transfectan en células anfitrionas tal como células E. coli, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células mieloma que no producen de otra forma la proteína inmunoglobulina, para obtener

289

la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células anfitrionas recombinantes. Los artículos de revisión en expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluye Skerra et al. , Curr. Opinion in Immunol, 5: 256 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

[00267] El ADN que codifica los clones Fv de la invención se puede combinar con las secuencias de ADN conocidas que codifican las regiones constantes de cadena liviana y/o pesada (por ejemplo las secuencias de ADN apropiadas se pueden obtener de Kabat et al., supra) para formar clones que codifican las cadenas pesada y/o liviana de longitud parcial o completa. Se apreciará que las regiones constantes de cualquier isotipo se pueden utilizar para este propósito, incluyendo las regiones constantes IgG, IgM, IgA, IgD, y IgE, y de tal manera que las regiones constantes se pueden obtener de cualesquier especies humana o animal. Un clon Fv derivado del ADN de dominio variable de una especie animal (tal como humano) y luego se fusiona al ADN de región constante de otra especie animal para formar secuencias codificantes para "híbrido," se incluye la cadena liviana y/o cadena pesada de longitud completa en la definición de anticuerpo "quimérico" y "híbrido" como se utiliza aquí. En ciertas realizaciones, un clon Fv derivado de ADN variable humano se fusiona con el ADN de región constante humana para formar secuencias codificantes para las cadenas liviana y/o pesada humana de longitud parcial o completa.

[00268] El anticuerpo anti-VEGF que codifica el ADN derivado de un hibridoma de la invención también se puede modificar, por ejemplo, al sustituir la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena liviana y pesada humana en lugar de secuencias de murino homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el método de Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 81:

190

6851 -6855 (1984)). El anticuerpo o fragmento Fv o hibridoma que codifica el ADN se puede modificar adicionalmente al unir convalentemente a la secuencia que codifica la inmunoglobulina todo o parte de la secuencia codificante para un polipéptido sin inmunoglobulina. De esta forma, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del clon Fv o los anticuerpos derivados de clone de hibridoma de la invención.

Vectores, Células Anfitrionas, y Métodos Recombinantes

[00269] También se pueden producir anticuerpos utilizando métodos recombinantes. Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-VEGF, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se puede aislar fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, al utilizar sondas de oligonucleótido que son capaces de unir específicamente a los genes que codifican las cadenas liviana y pesad del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento mejorador, un promotor, y una secuencia de terminación de transcripción.

Componente de la secuencia de señal

[00270] Un anticuerpo de la invención se puede producir recombinantemente no solo directamente, sino también una función de polipéptido con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia de señal u otro polipéptido que

291

tienen un sitio de división específico en el Terminal N de la proteína madura o polipéptido. La secuencia de señal heteróloga seleccionada preferiblemente es una que se reconoce y se procesa (es decir, se divide por una peptidasa de señal) mediante una célula anfitriona. Para células anfitrionas procarióticas que no reconoce y procesan una secuencia de señal de anticuerpo nativa, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal procariótica, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinasa, lpp, o líderes enterotoxina II estable al calor. Para la secreción de levadura la secuencia de señal nativa se puede sustituir mediante, por ejemplo, el líder invertasa de levadura, el líder de factor α (que incluye líderes del factor α Saccharomyces y Kluyveromyces), o líder de fosfatasa ácida, los C. líder glucoamilasa albicans, o la señal descrita en la WO 90/13646. En la expresión celular de mamífero, las secuencias de señal de mamífero así como también están disponibles los líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal herpes simplex gD.

Origen de replicación

[00271] Los vectores de clonación y expresión contienen una secuencia de ácido nucleico que permite replicar al vector en una o más células anfitrionas seleccionadas. Generalmente, en vectores de clonación esta secuencia es una que permite al vector replicar independientemente del ADN cromosómico anfitrión, e incluye orígenes de replicación o secuencias que replican autónomamente. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levadura, y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen de plásmido 2μ es adecuado para levadura, y varios orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonación de vectores en células de mamífero. Generalmente, el origen

292

del componente de replicación no se necesita para vectores de expresión de mamífero (el origen SV40 se puede utilizar típicamente solo debido a que este contiene el promotor temprano).

[00277] Alternativamente, las células anfitrionas (anfitriones tipo natural que contienen vHFR endógeno) transformado o co-tranformado con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de interés, gen DHFR tipo natural, y otro marcador seleccionable tal como 3'-fosfotransferasa aminoglicosida (APH) que se puede seleccionar mediante crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicosidico, por ejemplo, canamicina, neomicina, o G418. Véase Patente Estadounidense No.4,965,199.

[00278] Un gen de selección adecuado para uso en levadura es el gen trp1 presente en el plásmido YRp7 (Stinchcomb et al, Nature, 282:39 (1979)). El gen trp1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que le falta la capacidad de crecer en triptofan, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión trp1 en el genoma de célula anfitrión de levadura proporciona luego un ambiente efectivo para detectar la transformación mediante el crecimiento en la ausencia de triptofan. De manera similar, las cepas de levadura deficiente de Leu2- (ATCC 20,622 o 38,626) se complementan mediante plásmidos conocidos que llevan el gen Leu2.

[00279] Adicionalmente, se pueden utilizar vectores derivados de plásmido circular pKD1 de 1.6 µm para transformación de levadura Kluyveromyces. Alternativamente, se reporta un sistema de expresión para producción a gran

293

escala de quimosina de becerro recombinante para K. lactis. Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990). También se han descrito vectores de expresión multi-copia estables para secreción de albumina de suero humanos o recombinante madura mediante cepas industriales de Kluyveromyces. Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991).

Componente promotor

[00280] Vectores de clonación y clonación que contienen generalmente un promotor que se reconoce por el organismo anfitrión y se liga operablemente al ácido nucleico que codifica un anticuerpo. Los promotores adecuados para uso con anfitriones procariotico incluyen el promotor phoa, sistema de promotor lactosa y β-lactamasa, promotor fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptofan (trp), y promotores híbridos tal como promotor tac. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para uso en sistemas bacterianos También contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S. D.) ligada operablemente al ADN que codifica un anticuerpo.

[00281] Se conocen secuencias promotoras para eucariotes. Virtualmente todos genes eucarióticos tienen una región rica en AT ubicada aproximadamente 25 a 30 bases en la dirección cinco prima desde el sitio en donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encuentra 70 a 80 bases en la dirección cinco prima desde el inicio de la transcripción de muchos genes hay una región CNCAAT en donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucarióticos hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poliA al extremo 3' de la secuencia de la codificación. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en los vectores de expresión eucariótico.

294

[00282] Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con anfitriones de levadura incluyen promotores para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicoliticas, tal como enolasa, gliceraldehido-3 -fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato decarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3- fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucocinasa.

[00283] Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con metabolismo de nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehido-3 -fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables para la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores adecuados y promotores para uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en la EP 73,657. También se utilizan ventajosamente intensificadoras de levadura con los promotores de levadura.

[00284] la transcripción de anticuerpo de vectores en células anfitrionas de mamíferos se pueden controlar, por ejemplo, mediante promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tal como el virus polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B, Virus Simian 40 (SV40), o de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor actina o un promotor de inmunoglobulina, a partir de promotores de choque térmico, dado que tales promotores son compatible con sistemas celulares anfitrionas.

[00285] los promotores tempranos y tardíos del SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricciones SV40 que también contienen SV40 viral de origen de replicación. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humanos o se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en anfitriones mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como un vector se describe en la Patente Estadounidense No. 4,419,446. Una modificación de este sistema se describe en la Patente Estadounidense No. 4,601,978. ver También Reyes et al, Nature 297:598-601 (1982) en la expresión del cADN de β-interferon humanos o en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa a partir del virus herpes simplex. Alternativamente, se puede utiliza r el virus Rous Sarcoma Virus largo de repetición terminal como el promotor.

Componente de elemento intensificador

[00286] La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo de esta invención mediante eucariotes mayores se incrementa frecuentemente al insertar una secuencia intensificadora en el vector. Muchas secuencias intensificadoras se conocen ahora a partir de genes de mamíferos (globina, elastasa, albumina, α-feto proteína, y insulina). Típicamente, sin embargo, uno utiliza ría un intensificador a partir de un virus de célula eucariótico. Ejemplos incluyen el intensificador SV40 en el ultimo lado del origen de replicación (bp 100-270), el intensificador del promotor temprano citomegalovirus, intensificador polioma en el lado tardío del origen de replicación, e intensificadores de adenovirus. Ver También Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) en elementos intensificadores para la activación de promotores eucariótico. El intensificador se puede cortar y empalmar en el vector en la

posición 5' o 3´ a la secuencia de codificación de anticuerpo, pero se ubica preferiblemente en el sitio 5' del promotor.

Componente de terminación de Transcripción

[00287] los vectores de expresión utilizados en células anfitrionas eucarioticas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas a partir de otros organismos multicelulares) También contendrán secuencias necesarias para la terminación de transcripción y para estabilizar el mARN. Tales secuencias se encuentran disponibles comúnmente de las regiones 5' y, ocasionalmente 3', regiones no traducidas de ADNs o cADNs vírico o eucariótico. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcriptos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del mARN que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. Véase la WO94/1 1026 y el vector de expresión descrito allí.

Selección y transformación de células anfitrionas

[00288] las células anfitrionas adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores aquí son células procariotes, de levaduras, o células eucariote mayores descritas anteriormente. Los procariotes adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tal como organismos Gran-negativos o Gran- positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tal como Escherichia, por ejemplo, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, por ejemplo, Salmonella typhimurium, Serratia, por ejemplo, Serratia marcescans, y Shigella, así como también Bacilli tal como B. subtilis y B. licheniformis (por ejemplo, B. licheniformis 41P descrito en

297

DD 266,710 publicado el 12 Abril 1989), Pseudomonas tal como P. aeruginosa, y Streptomyces. Un E. coli preferido que clona el anfitrión es E. coli 294 (ATCC 31,446), aunque otras cepas tal como E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31,537), y E. coli W3110 (ATCC 27,325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos a diferencia de ser limitantes.

[00289] Anticuerpo de longitud completa, proteínas de fusión de anticuerpo, y fragmentos de anticuerpo se puede producir en bacterias, en particular cuando la glicosilación de la función efectora Fc no es necesaria, tal como cuando se conjuga el anticuerpo terapéutico con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) que por sí mismo muestra efectividad en la destrucción de células neoclásicas. Los anticuerpos de longitud completa tienen mayor vida media en circulación. La producción en E. coli es más rápida y más eficiente en costos. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, ver, por ejemplo, U.S. 5,648,237 (Carter et. al.), U.S. 5,789,199 (Joly et al.), U.S. 5,840,523 (Simmons et al), que describen la región de iniciación de traducción (TIR) y las secuencias de señal para optimizar la expresión y secreción. Véase También Charlton, Métodos in Molecular Biology, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humanosa Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión se fragmentos de anticuerpos en E. coli. Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de pasta de células E. coli en una fracción soluble y se pueden purificar a través de, por ejemplo, una columna o G de proteína A que depende del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de manera similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado por ejemplo, en células CHO.

[00290] en adición a los procariotes, los microbios eucarióticos tal como hongos filamentosos o levaduras son anfitriones de clonación y expresión adecuados para

vectores que codifican anticuerpos. Saccharomyces cerevisiae, o la levadura común de panadería, es la más comúnmente utiliza da entre los microorganismos anfitriones eucariótico menores. Sin embargo, un numero de otro género, especies, y cepas están disponibles comúnmente y son útiles aquí, tal como Schizosaccharomyces pombe; anfitriones Kluyveromyces tal como, por ejemplo, K. lactis, K. fragilis (ATCC 12,424), K. bulgaricus (ATCC 16,045), K. wickeramii (ATCC 24,178), Al waltii (ATCC 56,500), K drosophilarum (ATCC 36,906), AT. thermotolerans, y AT. marxianus; yarrowia (EP 402,226); Pichia pastoris (EP 183,070); Candida; Trichoderma reesia (EP 244,234); Neurospora crassa; Schwanniomyces tal como Schwanniomyces occidentalis; y hongos filamentosos tal como, por ejemplo, Neurospora, Penicillium, Tolypocladium, y anfitriones Aspergillus tal como A. nidulans y A. mger. Para revisar una discusión del uso de las levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Gerngross, Nat. Biotech. 22: 1409-1414 (2004).

[00291] Ciertas cepas de hongos y levaduras se pueden seleccionar en las que se ha "humanizado" las rutas de glicosilación, que resultan en la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o completamente humano. Ver, por ejemplo, Li et al, Nat. Biotech. 24:210-215 (2006) (que describe la humanización de la ruta de glicosilación en Pichia pastoris); y Gerngross et al, supra.

[00292] Las células anfitrionas adecuadas para la expresión del anticuerpo glicosilado también se deriva de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Ejemplos de células de invertebrados incluye plantas y células de insectos. Se han identificado numerosas cepas baculoviricas y variantes y células de anfitriones de insectos permisivos correspondientes de anfitriones tales como

299

Spodoptera frugiperda (oruga), Aedes aegypti (mosquito), Aedes albopictus (mosquito), Drosophila melanogaster (mosca de la fruta), y Bombyx mori. Una variedad de cepas víricas para transfeccion están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de Autografa californica NPVy la cepa Bm-5 de Bombyx mori NPV, y tales virus se pueden utiliza r como el virus aquí de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células de Spodoptera frugiperda.

[00293] cultivos de células de plantas de algodón, maíz, papa, soya, petunia, tomate, lenteja acuática (Lemnaceae), alfalfa (M. truncatuld), y tabaco también se pueden utiliza r como anfitriones. ver, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, y 6,417,429 (que describen tecnologías PL ANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

[00294] se pueden utiliza r células de vertebrados como anfitriones, y la propagación de las células de los vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) llega a ser un procedimiento de rutina. Ejemplos de estirpes de células de anfitrión de mamíferos útiles son estirpes CVI se riñón de mono transformadas mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); estirpes de riñón embriónico humanos (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al, J. Gen virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebe (BHK, ATCC CCL 10); células Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CVI 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 de riñón de canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3 A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (WI

280

38, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al, Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una estirpe de hepatoma humano (Hep G2). Otras estirpes de células anfitrionas de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células CHO DHFR$^-$ (Urlaub et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); y estirpes de células de mieloma tal como NSO y Sp2/0. Para una revisión de ciertas estirpes de células de anfitrión de mamíferos adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Métodos in Molecular Biology, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humanosa Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 255-268.

[00295] Las células anfitrionas se transforman con la expresión descrita anteriormente o los vectores de clonación para la producción de anticuerpos y se cultivan en medio de nutriente convencional modificado como apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican la secuencia deseada.

Cultivo de células anfitrionas

[00296] las células anfitrionas utiliza das para producir un anticuerpo de esta invención se puede cultivar en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente tal como Ham's F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI- 1640 (Sigma), y medio de Eagle´s modificado de Dulbecco's ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células anfitrionas. Adicionalmente, cualquiera de los medios descritos en Ham et al, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al, Anal. BiochemA02:255 (1980), Patentes Estadounidenses Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO 90/03430; WO

281

87/00195; o Patente Estadounidense Re. 30,985 se pueden utiliza r como medio de cultivo para las células anfitrionas. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tal como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tal como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), amortiguadores (tal como HEPES), nucleótidos (tal como adenosina y timidina), antibióticos (tal como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos de trazas (Definido como compuestos inorgánicos usualmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro complemento necesario También se puede incluir en concentraciones apropiadas que se conocerían por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tal como temperatura, pH, y similares, son aquellas utiliza das previamente con las células anfitrionas seleccionadas para la expresión, y serán evidentes para la persona medianamente versada en la materia.

Purificación de anticuerpos

[00297] cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los residuos particulados, ya sean células anfitrionas o fragmentos lisados, se remueven, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al, Bio/Technology 10:163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de E. coll en resumen, la pasta celular se descongela en la presencia de acetato de sodio (pH 3.5), EDTA, y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos celulares se pueden remover mediante centrifugación. cuando se secreta el

282

anticuerpo en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran generalmente primero utilizando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

[00298] la composición de anticuerpo preparada a partir de células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis de gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una de las etapas de purificación típicamente preferidas. La adecuación de la proteína A como un ligando de afinidad depende de las especies e isotipo de cualquier dominio Fc inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utiliza r para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas gama γl, γ2, o γ4 (Lindmark et al, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para γ3 humano (Guss et al, EMBO J. 5:15671575 (1986)). La matriz a la que se adhiere el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero otras matrices están disponibles. Las matrices estables mecánicamente tal como vidrio de poro controlado o poli(stirenedivinil) benceno permiten índices de flujo más rápidos y tiempo de procesamiento más cortos que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tal como fraccionamiento sobre una columna de intercambio de iones, precipitación de etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía en heparina, cromatografía SEPHAROSE™ sobre una resina de intercambio de anión o catión (tal como una columna de ácido

poliaspartico), cromatoenfoque, SDS-PAGE, y precipitación de sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a ser recuperado.

[00299] luego de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se pueden someter a cromatografías de interacción hidrófoba de pH bajo utilizando un amortiguador de elución en un pH de entre aproximadamente 2.5-4.5, preferiblemente desarrollado a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, de aproximadamente 0- 0.25M de sal).

[00300] en general, varias metodologías para preparar anticuerpos para uso en investigación, pruebas, y clínica se establecen bien en la técnica, consistentes con las metodologías descritas anteriormente y/o consideradas apropiadas por el experto en la técnica para un anticuerpo de interés particular.

Formulaciones Farmacéuticas y Dosificaciones

[00301] La composición de anticuerpo se formulará, dosificará, y administrará en una forma consistente con la buena práctica médica. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente efectiva" del anticuerpo al ser administrado se regirá por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para evitar, aliviar, o tratar una enfermedad o trastorno. El anticuerpo no necesita ser, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes utilizados actualmente para evitar o tratar

784

el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de tal otro agente depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores discutidos anteriormente. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosificaciones y con rutas de administración como se utiliza aquí o aproximadamente de 1 a 99% de las dosificaciones empleadas aquí. Generalmente, el alivio o el tratamiento de una enfermedad o trastorno involucran la reducción de uno o más síntomas o problemas médicos asociados con la enfermedad o trastorno. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede logra uno o una combinación de lo siguiente: reducir el número de células neoplásicas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, reducir en algún grado y/o detener) la infiltración de células neoplásicas en órganos periféricos; inhibir la metástasis de tumor; inhibir, en algún grado, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en algún grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. El grado en el que el fármaco pueda evitar el crecimiento y/o muerte de células neoplásicas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. En algunas realizaciones, se puede utiliza r una composición de esta invención para evitar el inicio o recurrencia de la enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero.

[00302] para la previsión o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se utilice solo o en combinación con uno o más de otros agentes Terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a ser tratada, el tipo de anticuerpo, la severidad curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para propósitos terapéuticos o preventivos, terapia previa, historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente de una sola vez o durante una serie de tratamientos.

185

[00303] en ciertas realizaciones, dependiendo del tipo y la severidad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0.1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. En otra realización, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0.1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se sostiene hasta que ocurra una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad.

[00304] Una dosificación de ejemplo del anticuerpo estaría en el rango de aproximadamente 0.05 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. Así, una o más dosis de aproximadamente 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg, 7.5 mg/kg, 10 mg/kg o 15 mg/kg (o cualquier combinación de estos) se puede administrar al paciente. Tales dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo cada día, cada tres días, cada semana o cada dos a tres semanas (por ejemplo, de tal manera que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). En una realización, la dosis de aproximadamente 10 mg/kg se administra cada tres días. Una mayor dosis de carga inicial, seguida por una o más dosis menores se puede administrar. En una realización, un régimen de dosificación de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida por una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación.

186

[00305] En ciertas realizaciones, los regímenes de dosificación discutidas aquí se utilizan en combinación con un régimen de quimioterapia como la primer línea de terapia para tratar cáncer colorectal metastásico. En algunos aspectos, el régimen de quimioterapia involucra la administración intermitente de altas dosis tradicionales. En otros aspectos, los agentes quimioterapéuticos se administran utilizando dosis más pequeñas y más frecuentes sin interrupción del programa ("quimioterapia metronomica ").

[00306] El progreso de la terapia de la invención se monitorea fácilmente mediante técnicas convencionales y ensayos.

[00307] El anticuerpo de la invención (y cualquier otro agente o adyuvante terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, que incluye administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonal, e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Adicionalmente, el anticuerpo se administra en forma adecuada mediante infusión de pulso, particularmente con dosis declinantes del anticuerpo. La dosificación puede ser mediante cualquier ruta adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tal como inyección intravenosa o subcutánea, que depende en parte de si la administración es breve o crónica.

[00308] las formulaciones farmacéuticas aquí También pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferiblemente aquellas con actividades complementarias que no afectan

adversamente una a la otra. Tales moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son efectivas para el uso propuesto.

[00309] Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención se preparan para almacenamiento al mezclar el anticuerpo que contiene el grado de pureza deseado con portadores fisiológicamente aceptables opcionales, excipientes o estabilizantes (Remington: The Science y Practice of Pharmacy 20th edition (2000)), en la forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas. Portadores aceptables, excipientes, o estabilizantes son no tóxicos a los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, en incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; los antioxidantes incluyen ácido ascórbico y metionina; los conservantes (tal como cloruro amonio octadecildimetilbencil; cloruro hexametonio; cloruro benzalconio, cloruro benzetonio; fenol, butilo o alcohol bencilo; alquil parabenos tal como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3- pentanol; y m-cresol); poli péptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tal como albumina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; azucares tales como sacarosa, mannitol, trehalosa o sorbitol; contra inones formadores de sal tal como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o tenso activos no iónicos tal como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

[00310] los ingredientes actives También se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante

288

polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albumina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington: The Science y Practice of Pharmacy 20ma edición (2000).

[00311] Las formulaciones a ser utiliza das para administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

[00312] Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, cuyas matrices están en la forma de artículos, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2- hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patentes Estadounidenses No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutamico y γ etil-L-glutamato, acetato de vinil etileno no-degradable, copolímeros de ácido glicólico – ácido láctico degradables tal como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido glicolico – ácido láctico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutirico. Aunque polímeros tales como acetato de vinil etileno y ácido glicólico – ácido láctico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertas proteínas liberan hidrogeles ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos más cortos. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante bastante tiempo, ellas pueden desnaturalizarse

o acumularse como un resultado de la exposición a la humedad a 37°C, resultando en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden prever estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de aglomeración es la formación de enlaces S-S intermolecular a través de intercambio de tio-disulfuro, puede alcanzar la estabilización al modificar los residuos sulfhídrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad; utilizando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz de polímero especificas.

Métodos

Métodos Terapéuticos

[00313] Un anticuerpo de la invención se puede utiliza r en, si por ejemplo, métodos terapéuticos in vitro, ex vivo, y in vivo.

[00314] En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar o prevenir un tumor, un cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, trastorno asociado con expresión incrementada y/o actividad de VEGF) que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto en necesidad de tal tratamiento.

[00315] En otro aspecto, la invención proporciona métodos para reducir, inhibir, bloquear, o evitar el crecimiento de un tumor o cáncer, los métodos comprenden administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto en necesidad de tal tratamiento.

290

[00316] En otro aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir angiogenia que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto en necesidad de tal tratamiento.

[00317] En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la permeabilidad vascular que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto en necesidad de tal tratamiento.

[00318] En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar una afección patológica asociada con angiogenia que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto en necesidad de tal tratamiento. En algunas realizaciones, la afección patológica asociada con la angiogenia es un tumor, un cáncer, y/o un trastorno celular proliferativo.

[00319] Un anticuerpo de la invención se puede administrar a un humano para propósitos terapéuticos. En una realización, se utiliza un anticuerpo de la invención en un método para unir el VEGF en un individuo que sufre un trastorno asociado con la actividad y/o expresión VEGF incrementada, el método comprende administrar al individuo el anticuerpo de tal manera que se una el VEGF en el individuo. En una realización, el VEGF es VEGF humano, y el individuo es un individuo humano. Alternativamente, el individuo puede ser un mamífero que expresa VEGF al que se une un anticuerpo de la invención. Más aun el individuo puede ser un mamífero en el que se ha introducido el VEGF (por ejemplo, mediante administración de VEGF o mediante expresión de un transgen que codifica VEGF).

291

[00320] En un aspecto, por lo menos uno de los anticuerpos de la invención puede unir el VEGF de especies diferentes a la humana. De acuerdo con la anterior, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para unir la actividad de antígeno especifica, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene el antígeno, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen el antígeno con el que tiene una reacción cruzada el anticuerpo de la invención (por ejemplo, chimpancé, mandril, tití, macaco y macaco de la india, cerdo o ratón). En una realización, el anticuerpo de la invención se puede utilizar para inhibir las actividades de antígeno al poner en contacto el anticuerpo con el antígeno de tal manera que se inhibe la actividad del antígeno. Preferiblemente, el antígeno es una molécula de proteína humana.

[00321] Más aun, un anticuerpo de la invención se puede administrar a un mamífero no humano que expresa VEGF con el que tiene reactividad cruzada el anticuerpo (por ejemplo, un primate, cerdo, rata, o ratón) para propósitos veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto al último, tales modelos de animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, prueba de dosificación y curso de tiempo de administración).

[00322] Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar para tratar, inhibir, retardar la progresión de, evitar/tratar la recurrencia de, aliviar, o evitar enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la expresión y/o actividad de una o más moléculas de antígeno.

[00323] La presente invención abarca la prevención y tratamiento de metástasis de tumor y terapia de cáncer anti-angiogénica, una estrategia de tratamiento del cáncer novedosa dirigida a inhibir el desarrollo de bazos sanguíneos de tumor

292

requeridos para proporcionar nutrientes que soportan el crecimiento del tumor. La invención incluye específicamente la inhibición del crecimiento neoplástico del tumor en el sitio primario así como también evitar y/o tratar la metástasis de los tumores en los sitios secundarios, permitiendo por lo tanto el ataque de tumores por otros agentes terapéuticos. Ejemplos de cáncer a ser tratado (que incluyen prevención) aquí incluye, pero no se limita a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasia linfoide. Ejemplos más particulares de tales canceres incluye cáncer de célula epidermoide (por ejemplo, cáncer de célula epidermoide epitelial), cáncer de pulmón que incluye cáncer de microcítico de pulmón, cáncer no microcítico de pulmón, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del perineo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal que incluye canceres gastrointestinales y cáncer estromal gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorectal, de endometrio o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer renal o de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, melanoma de extrusión superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginoso acral, melanomas nodulares, mieloma múltiple y linfoma de células B (que incluyen linfoma no Hodgkin folicular de bajo grado (NHL); NHL linfocitico pequeño (SL); NHL folicular de grado intermedio; NHL difuso grado intermedio; NHL immunoblastico grado alto; NHL linfoblastico grado alto; NHL de célula no dividida pequeña grado alto; NHL de enfermedad de volumen; linfoma de célula de manto; linfoma relacionado con SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblastica aguda (ALL); leucemia de célula capilar; leucemia mieloblastica crónica; y trastornos linfoproliferativos post trasplante (PTLD), así como también

293

proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como aquella asociada con tumor cerebral), síndrome de Meig, cerebro, así como también cáncer de cabeza y cuello, y metástasis asociada. En ciertas realizaciones, los cánceres que son susceptibles al tratamiento por los anticuerpos de la invención incluyen cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer rectal, cáncer no microcítico de pulmón, linfoma no Hodgkins (NHL), cáncer de célula renal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de tejido blando, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, mesotelioma, y mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer microcítico de pulmón, neuroblastomas, melanoma, carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorectal (CRC), y carcinoma hepatocelular. Aun, en algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer no microcítico de pulmón, cáncer colorectal y carcinoma de mama, que incluye formas metastaticas de aquellos canceres.

[00324] en ciertas realizaciones, se administra un immunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos al paciente. En algunas realizaciones, el immunoconjugado y/o antigen al que se une se internalice por la célula, resultando en eficacia terapéutica incrementada del immunoconjugado en la muerte de la célula objetivo a la que se une. En una realización, el agente citotóxico se dirige a o interfiere con el acido nucleico en la célula objetivo. En una realización, el agente citotóxico se dirige a o interfiere con la polimerización de microtubulo. Ejemplos de tales agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos listados aquí (tal como maitansinoide, auristatina, dolastatina, o una caliquiamicina), un isotopo radioactivo, o una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN.

[00325] cuando el objetivo de un anticuerpo se ubica en el cerebro, ciertas realizaciones de la invención el anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica. Existen varios métodos conocidos en la técnica para transportar moléculas a través de la barrera hematoencefálica, que incluye, pero no se limita a, métodos físicos, métodos basados en lípidos, métodos basados en células madre, y receptores y métodos basados en canal.

[00326] los métodos físicos para transportar un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, rodear completamente la barrera hematoencefálica, o crear aberturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de circunvencion, incluyen, pero no se limitan a, inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou et al, Gene Therapy 9: 398-406 (2002)), suministro mejorado infusión/convección interficial (véase, por ejemplo, Bobo et al, Proc. Natl. Acad. ScL USA 91: 2076-2080 (1994)), e implantar un dispositivo de suministro en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos para crear aberturas en el cerebro incluyen, pero no se limitan a, ultrasonido (véase, por ejemplo, publicación de patente estadounidense No. 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, mediante administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier y its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989)), permeabilización mediante, por ejemplo, bradiquinina o permeabilizar A-7 (véase, por ejemplo, patente estadounidense No. 5,1 12,596, 5,268,164, 5,506,206, y 5,686,416), y transfección de neuronas que montan la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo (véase, por ejemplo, U.S. publicación de patente estadounidense No. 2003/0083299). [00327] métodos basados en lípidos de transponer anticuerpo a

295

través de la barrera incluye, pero no se limita a, encapsular el anticuerpo en liposomas que se acoplan a fragmentos de unión de anticuerpo que se unan a receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense No. 20020025313), y que contiene el anticuerpo en partículas de lipoproteína de baja densidad (ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense No. 20040204354) o apolipoproteina E (véase, por ejemplo, publicación de patente estadounidense No. 20040131692).

[00328] Los métodos basados en células madre de trasponer un anticuerpo a través de la barrera hematoencefálica que implica células progenitoras neuronales construidas con ingeniería genética (NPCs) para expresar el anticuerpo de interés y luego implantarlo y luego implantar las células madre en el cerebro del individuo a ser tratado. Véase Behrstock et al. (2005) Gene Ther. 15 Dec. 2005 publicación en línea avanzada (reportando que el NPC construido con ingeniería genética expresa los síntomas reducidos GDNF del factor neurotrópico de la enfermedad de Parkinson cuando se implanta en los cerebros de roedores y primates).

[00329] Los métodos de transporte de un anticuerpo basados en canal y receptor a través de la barrera hematoencefálica incluye, pero no se limita a, utilización de bloqueadores glucocorticoides para incrementar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2002/0065259, 2003/0162695, y 2005/0124533); activando los canales de potasio (véase, por ejemplo, IJ. S. publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2005/0089473), que inhibe transportadores de fármaco ABC (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2003/0073713); recubrimiento de anticuerpos con una

296

actividad de modulación y transferrina de uno o más receptores de transferrina (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2003/0129186), y cationizar los anticuerpos (véase, por ejemplo, patente estadounidense No. 5,004,697).

[00330] se entiende que cualquiera de los anteriores métodos terapéuticos se pueden llevar a cabo utilizando un immunoconjugado de la invención en lugar de o en adición a un anticuerpo anti-VEGF.

Terapias de combinación

[00331] se pueden utilizar anticuerpos de la invención ya sean solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede co-administrar con otro anticuerpo, agentes quimioterapéuticos (que incluyen cocteles de agentes quimioterapéuticos), otros agentes citotóxicos, agentes anti-angiogénicos, citocinas, y/o agentes inhibidores del crecimiento. Cuando un anticuerpo de la invención inhibe el crecimiento del tumor, puede ser particularmente deseable combinarlo co uno o más de otros agentes terapéuticos que también inhiben el crecimiento del tumor, por ejemplo, agentes anti-angiogénicos y/o agentes quimioterapéuticos. Alternativamente, o adicionalmente, el paciente puede recibir terapia de radiación (por ejemplo irradiación de rayos externos o terapia con agente etiquetado radiactivo, tal como un anticuerpo). Tales terapias combinadas enumeradas anteriormente incluyen la administración combinada (cuando dos o más agentes se incluyen en la misma formulación o formulaciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede ocurrir antes de, y/o luego, de la administración de la terapia o terapias.

297

[00332] Una realización, un anticuerpo de la invención puede ser co- administrar con por lo menos un agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Por ejemplo, se utilizan anticuerpos anti-VEGF en combinaciones con terapéuticos anti-cáncer o terapéuticos anti-neo vascularización para tratar varias condiciones neoplásicas o no neoplásicas. En una realización, las afecciones neoplásicas o no neoplásicas se caracterizan por trastornos patológicos asociados con la angiogenia aberrante o indeseada. El anticuerpo anti-VEGF se puede administrar seriamente o en combinación con otros agentes que es efectivo para aquellos propósitos, ya sea en la misma composición o como composiciones separadas. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden administrar múltiples inhibidores múltiples del VEGF.

[00333] Típicamente, los anticuerpos anti-VEGF y los agentes anti-cáncer son adecuados para las mismas enfermedades o enfermedades similares para bloquear o reducir un trastorno patológico tal como un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular. En una realización el agente anti cáncer es un agente anti-angiogénico.

[00334] se han identificado muchos agentes antiangiogénicos y se conocen en la técnica, incluyendo aquellos listados aquí, por ejemplo, listado en la sección "Definiciones", y por, por ejemplo, Carmeliet and Jain, Nature 407:249-257 (2000); Ferrara et al, Nature Reviews: Drug Discovery, 3:391-400 (2004); y Sato Int. J. Clin. Oncol, 8:200-206 (2003). Ver también, Solicitud de Patente Estadounidense US20030055006.

[00335] En una realización, un anti-VEGF de la presente invención se utiliza en combinación con uno o más anticuerpos neutralizantes anti-VEGF (o fragmentos),

298

antagonista a otra familia VEGF (por ejemplo, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, factor de crecimiento placentario (PLGF)) o un antagonista del receptor VEGF que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, receptor VEGF soluble (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, fragmentos de neuropillinas (por ejemplo, NRP1 , NRP2)), aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos neutralizantes anti-VEGFR, inhibidores de bajo peso molecular de tirosinas cinasas VEGFR (RTK), estrategias anticodificantes para VEGF, ribozimas contra VEGF o receptores VEGF, variantes de antagonista de VEGF; y cualquier combinación de los mismos.

[00336] En otra realización, al anticuerpo anticuerpo anti-VEGF de la invención se puede utilizar en combinación con inhibidores de tirosina cinasa de receptor de molécula pequeña (RTKI) que van dirigidos a uno o más receptores de tirosina cinasa tal como receptores VEGF, receptores FGF, receptores EGF y receptores PDGF. Se conocen en la técnica muchas moléculas pequeñas terapéuticas RTKI, que incluyen, pero no se limitan a, vatalanib (PTK787), erlotinib (TARCEV A®), OSI-7904, ZD6474 (ZACTIMA®), ZD6126 (ANG453), ZDI 839, sunitinib (SUTENT®), semaxanib (SU5416), AMG706, AG013736, Imatinib (GLEEVEC®), MLN-518, CEP-701 , PKC- 412, Lapatinib (GSK572016), VELCADE®, AZD2171 , sorafenib (NEXA V AR®), XL880, y CHIR-265.

[00337] Otros agentes terapéuticos útiles para combinación de terapia de tumor con el anticuerpo de la invención incluyen antagonistas de otros factores que están involucrados en el crecimiento de tumor, tal como EGFR, ErbB2 (también conocido como Her2) ErbB3, ErbB4, o TNF.

299

[00338] En ciertas realizaciones, dos o más inhibidores de angiogenia se puede coadministrar opcionalmente al paciente en adición a los antagonistas VEGF y otro agente. En todavía otra realización, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes antineoplásico se pueden administrar en combinación con un anticuerpo anti-VEGF de la presente invención, un antagonista a otra familia de VEGF, y/o un agente anti- angioénico.

[00339] En ciertos aspectos de la invención, otros agentes terapéuticos útiles para combinación de terapia de tumor con un anticuerpo anti-VEGF incluyen otras trepáis de cáncer (por ejemplo, cirugía, tratamientos radiológicos (por ejemplo, que involucran irradiación o administración de sustancias radioactivas), quimioterapia, tratamiento con agentes antineoplásico enumerados aquí y conocidos en la técnica, o combinaciones de los mismos). Una lista no limitante de ejemplo de agentes quimioterapéuticos contemplados se suministra aquí en la sección "Definiciones."

[00340] Alternativamente, o adicionalmente, dos o más anticuerpos que unen el mismo o dos antígenos diferentes descritos aquí se pueden coadministar al paciente. Algunas veces, puede ser benéfico también administrar una o más citocinas al paciente.

[00341] Las cantidades efectivas de agentes terapéuticos administrados en combinación con un anticuerpo anti-VEGF estarán a discreción del médico o veterinario. La administración y ajuste de la dosificación se hace para alcanzar el manejo máximo de las afecciones a ser tratadas. La dosis dependerá de factores tal como el tipo de agente terapéutico a ser utilizado y el paciente específico que se trata. Las dosificaciones para el agente antineoplásico son aquellas utilizadas

300

actualmente y se pueden reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente antineoplásico y el anticuerpo anti- VEGF. En ciertas realizaciones, la combinación de los inhibidores potencia la eficacia de un único inhibidor. El término "potencia" se refiere a una mejora en la eficacia de un agente terapéutico en su dosis común o aprobada. Ver también aquí la sección titulada *Formulaciones Farmacéuticas y Dosificación*.

Agentes quimioterapéuticos

[00342] En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar un trastorno (tal como un tumor, un cáncer, o un trastorno celular proliferativo) al administrar cantidades efectivas de un anticuerpo anti-VEGF y/o un inhibidor de angiogenia y uno o más agentes quimioterapéuticos. Se puede utilizar una variedad de agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinado de la invención. Una lista de ejemplo y no limitante de agentes quimioterapéuticos contemplados se proporciona aquí en la "Definiciones." La administración del anticuerpo anti-VEGF y el agente quimioterapéutico se puede hacer simultáneamente, por ejemplo, como una única composición o como dos o más composiciones distintas, utilizando la misma ruta de administración o diferente ruta de administración. Alternativamente, o adicionalmente, la administración se puede hacer secuencialmente, en cualquier orden. Alternativamente, o adicionalmente, las etapas se pueden desarrollar como una combinación de ambas secuencialmente y simultáneamente, en cualquier orden. En ciertas realizaciones, los intervalos varían de minutos a días, a semanas a meses, que se pueden presentar entre las administraciones de dos o más composiciones. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico se puede administrar primero, seguido por el anticuerpo anti-VEGF. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la

301

administración del primer anticuerpo anti-VEGF. De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención proporciona métodos que comprenden la administración de un anticuerpo anti-VEGF (tal como B20- 4.1.1 o anticuerpo B20-4.1.1RR), seguido por la administración de un agente quimioterapéutico. En ciertas realizaciones, los intervalos varían de minutos a días, a semanas a meses, pueden estar presentes entre las administraciones de dos o más composiciones.

[00343] Como entenderán aquellas personas medianamente versadas en la técnica, las dosis apropiadas de agentes quimioterapéuticos generalmente estarán alrededor de aquellas ya empleadas en terapias químicas en donde se administran quimioterapéuticos solos o en combinación con otros quimioterapéuticos. La variación de la dosificación ocurrirá probablemente dependiendo de la afección que se trata. El médico que administra el tratamiento será capaz de determinar la dosis apropiada para el sujeto individual.

Caída de Crecimiento de Tumor

[00344] La invención también proporciona métodos y composiciones para inhibir o prevenir la recaída del crecimiento de tumor o recaída de crecimiento de células neoplásicas. La recaída del crecimiento del tumor o recaída del crecimiento de células neoplásicas se utiliza para describir una afección en la que los pacientes que sufren o se tratan con una o más terapias disponibles actualmente (por ejemplo, terapias contra el cáncer, tal como quimioterapia, terapia de radiación, cirugía, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia, terapia de anticuerpo anti-VEGF, particularmente un régimen terapéutico estándar para el cáncer particular) no es clínicamente adecuado tratar los pacientes o los pacientes no reciben más ningún efecto benéfico de la terapia de tal manera que estos

302

pacientes necesitan terapia efectiva adicional. Como se utiliza aquí, la frase también se puede referir a una afección del paciente "no se sensible/refractario" por ejemplo, que describe pacientes que responden a la terapia y sufre aún de efectos colaterales, resistencia al desarrollo, no responden a la terapia, no responden satisfactoriamente a la terapia, etc. En varias realizaciones, un cáncer es la recaída del crecimiento del tumor o recaída de crecimiento de célula neoplásica en donde el número de células cancerosas no se ha reducido significativamente, o se ha incrementado, o el tamaño del tumor no se ha reducido significativamente, o ha incrementado, o falla en cualquier reducción adicional en el tamaño o en el número de las células neoplásicas. La determinación de si las células neoplásicas tienen recaída de crecimiento de tumor o recaída de crecimiento de células neoplásicas se puede hacer in vivo o in vitro mediante cualquier método conocido en la técnica para ensayar la efectividad del tratamiento de las células neoplásicas, utilizando los significados aceptados en la técnica de "recaída" o "refractario" o "no sensible" en tal contexto. Un tumor resistente al tratamiento anti-VEGF es un ejemplo de una recaída de crecimiento de tumor.

[00345] La invención proporciona métodos para bloquear o reducir la recaída del crecimiento de tumor o recaída de crecimiento de célula neoplásica en un sujeto al administra uno o más anticuerpos anti-VEGF de la presente invención para bloquear o reducir la recaída de crecimiento de tumor o la recaída de crecimiento de célula neoplásica en un sujeto. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se puede administrar posteriormente al terapéutico de cáncer. En ciertas realizaciones, se administran anticuerpos anti-VEGF simultáneamente con terapia contra el cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, la terapia de anticuerpo anti-VEGF alterna con otra terapia de cáncer, que se puede desarrollar en cualquier orden. La invención

303

también abarca métodos para administrar uno o más anticuerpos inhibidores para evitar el inicio de la recurrencia del cáncer en pacientes predispuestos a tener cáncer. Generalmente, el sujeto está o experimenta actualmente terapia de contra el cáncer. En una realización, la terapia contra el cáncer es el tratamiento con un agente anti-angiogénico, por ejemplo, un antagonista VEGF-C. El agente anti-angiogénico incluye, pero no se limita a aquellos conocidos en la técnica y encontrados bajo la sección "Definiciones". En una realización, el agente anti-angiogénico está en un anticuerpo o fragmento neutralizante anti-VEGF (por ejemplo, A4.6.1 humanizado, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Ver, por ejemplo, Patentes Estadounidenses 6,582,959, 6,884,879, 6,703,020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1 ; Solicitudes de Patente Estadounidenses 20030206899, 20030190317, 20030203409, y 20050112126; Popkov et al, Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004); y, WO2005012359. Se pueden administrar agentes adicionales en combinación con anticuerpo anti-VEGF para bloquear o reducir la recaída de crecimiento de tumor o la recaída de crecimiento de célula neoplásica, por ejemplo, véase la sección titulada Terapias de Combinación.

Métodos de diagnóstico y métodos de detección.

[00346] En un aspecto, la invención proporciona un método para diagnosticar un trastorno asociado con la expresión incrementada del VEGF. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula de prueba con un anticuerpo anti-VEGF; determinar el nivel de expresión (ya sea cualitativamente o cuantitativamente) del VEGF mediante la célula de prueba al detectar la unión del anticuerpo anti-VEGF con VEGF; y comparar el nivel de expresión del VEGF

mediante célula de prueba con el nivel de expresión del VEGF con una células de control (por ejemplo, una célula normal del mismo tejido de origen que en la célula de prueba o una célula que expresa VEGF en niveles comparables a tal célula normal), en donde un mayor nivel de expresión del VEGF mediante la célula de prueba según se compara con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado la expresión incrementada del VEGF. En ciertas realizaciones, la célula de prueba se obtiene a partir de un individuo que se sospecha que tiene un trastorno asociado con la expresión incrementada del VEGF. En ciertas realizaciones, el trastorno es un tumor, cáncer, y/o trastorno proliferativo celular.

[00347] Trastornos de ejemplo que se pueden diagnosticar utilizando un anticuerpo de la invención incluyen, pero no se limitan a, cáncer de células epidermoides, cáncer microcítico de pulmón, cáncer no microcítico de pulmón, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma epidermoide de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer del estromal gastrointestinales, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer vervical, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma uterino o endometrial, carcinoma de glándulas salivales, o cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata , cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer hepático y vários tipos de cáncer de cabeza y cuello y, melanoma, melanoma de dispersión superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginoso acrales, melanoma nodular, linfoma de células B, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia de célula capilar, leucemia mieloblástica crónica, trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema asociado con tumor cerebral y síndrome de Meigs.

30 s.

[00348] En otro aspecto, la invención proporciona un complejo de cualquiera de los anticuerpos anti-VEGF descritos aquí y VEGF. En algunas realizaciones, el complejo es en vivo o in vitro. En algunas realizaciones, el complejo comprende una célula neoplásica.

[00349] En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia de VEGF en una muestra biológica. El término "detectar" como se utiliza aquí abarca la detección cualitativa o cuantitativa.

[00350] En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-VEGF bajo condiciones permisivas para unir el anticuerpo el anti-VEGF al VEGF, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-VEGF y el VEGF.

[00351] Se pueden utiliza r anticuerpos anti-VEGF para la detección del VEGF en uno cualquiera de un número de métodos de ensayo de detección bien conocidos. Por ejemplo, se puede ensayar una muestra biológica para el VEGF al obtener la muestra a partir de una fuente deseada, mezclar la muestra con anticuerpo anti-VEGF para permitir que el anticuerpo forme el complejo anticuerpo/VEGF con cualquier VEGF presente en la mezcla, y detectar cualquier complejo de anticuerpo/VEGF presente en la mezcla. La muestra biológica se puede preparar para ensayo mediante métodos conocidos en la técnica que son adecuados para la muestra en particular. Los métodos de mezcla de la muestra con anticuerpos y los métodos para detectar el complejo de anticuerpo/VEGF se seleccionan de acuerdo con el tipo de ensayo utilizado.

[00352] Métodos analíticos para VEGF todos utilizan uno o más de los siguientes reactivos: análogo VEGF etiquetados, análogos VEGF inmovilizado, anticuerpo anti-VEGF etiquetado, anticuerpo anti-VEGF inmovilizado y/o conjugados estéricos. Los reactivos etiquetados también se conocen como "trazadores."

[00353] En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF se etiqueta de manera detectable. La etiqueta utiliza da es cualquier funcionalidad detectable que no interfiere con la unión del VEGF y el anticuerpo anti-VEGF. Las etiquetas incluyen, pero no se limitan a, etiquetas o grupos funcionales que se detectan directamente (tal como etiquetas fluorescentes, cromofóricas, de densidad de electrones, quimioluminescentes, y radioactivas), así como también grupos funcionales, tal como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Las etiquetas de ejemplos incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, H, y ^{131}I, los fluoróforos tal como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luceriferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patentes Estadounidenses No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidrophthalazinedionas, peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas sacaridas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tal como uricasa y oxidasa xantina, acopladas con unas enzimas que emplea peróxido de hidrogeno para oxidar un precursor de tinte tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, etiquetas de giro, etiquetas bacteriófago, radicales libres estables, y similares.

[00354] Están disponibles métodos convencionales para unir estas etiquetas covalentemente a proteínas o a polipéptidos. Por ejemplo, agentes de

acoplamiento tal como dialdehidos, carbodiimidas, dimaleimidas, bis-imidatos, bencilina bis-diazotizada, y similares se pueden utiliza r para etiquetar los anticuerpos con la etiqueta fluorescente, quimioluminescente, y de enzima descrita anteriormente. Ver, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 3,940,475 (fluorimetria) y 3,645,090 (enzimas); Hunter et al., Nature, 144: 945 (1962); David et al, Biochemistry, 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., J. Immunol. Metodos, 40: 219-230 (1981); y Nygren, J. Histochem. y Cytochem., 30: 407-412 (1982). Las etiquetas preferidas aquí son enzimas tal como peroxidasa de rábano y fosfatasa alcalina. La conjugación de tales etiquetas, incluyendo las enzimas, con los anticuerpos es un procedimiento de manipulación estándar para una persona medianamente versada en el arte en técnicas de inmunoensayos. Ver, por ejemplo, O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzima-antibody Conjugates for Use in Enzima Immunoassay," in Methods in Enzymology, ed. Jj. Langone and H. van vunakis, vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166.

[00355] En ciertas realizaciones, los anticuerpos se inmovilizan sobre una matriz insoluble. La insolubilización se puede dirigir a la separación de un anticuerpo anti-VEGF de cualquier VEGF que permanece libre en solución. Esta se logra convencionalmente al insolubilizar el anticuerpo anti-VEGF antes del procedimiento de ensayo, como mediante absorción a una superficie o matriz insoluble en agua (Bennich et al, U.S. 3,720,760), o mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, utilizando reticulación de glutaraldehído), o al insolubilizar el anticuerpo anti-VEGF después de formación de un complejo entre el anticuerpo anti- VEGF y el VEGF, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

[00356] Los ensayos utilizados para detectar la unión de anticuerpo anti-VEGF al VEGF incluye, pero no se limitan a, ensayos de unión a antígeno que se conocen bien en la técnica, tal como western blots, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente inmunizado ligado a enzima), ensayo de "intercalamiento" y competitivos, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos inmunofluorescentes, inmunoensayos de proteína A, ensayos de inmunohistoquimica (IHC) y ensayos de inhibición estérica.

[00357] En una realización, la expresión de proteína en una muestra se puede examinar utilizando protocolos de inmunohistoquímica y tenido. El teñido inmunohistoquímico de las secciones de tejido se ha mostrado que son un método confiable para evaluar o detectar la presencia de proteína en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") utilizan un anticuerpo para sondear y visualizar antígenos celulares in situ, generalmente mediante métodos cromogénicos o fluorescentes. Para la preparación de la muestra, se puede utiliza r un tejido o muestra de célula de un mamífero (típicamente un paciente humano). Ejemplos de muestras incluyen, pero no se limitan a, células de cáncer tal como colon, mama, próstata, ovario, pulmón, estomago, páncreas, linfoma, y células de cáncer de leucemia. La muestra se puede obtener mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluye; pero no se limita a excusión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, la muestra se fija y se coloca en parafina o similares. La muestra de tejido se puede fijar (es decir, preservar) mediante metodología convencional. Un experto en la técnica apreciara que la elección de un fijador se determina mediante el propósito para el que la mezcla se tiñe histológicamente o se analiza de otra forma. Una persona medianamente versada en la técnica también

309

apreciara que la longitud de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y el fijador utilizado.

[00358] El IHC se puede desarrollar en combinación con técnicas adicionales tales como teñido morfológico y/o hibridación de fluorescencia in-situ. Hay dos métodos generales de IHC disponibles; ensayos directos e indirectos. De acuerdo con el primer ensayo, la unión de un anticuerpo al antígeno objetivo (por ejemplo, VEGF) se determina directamente. Este ensayo directo utiliza un reactivo etiquetado, tal como una etiqueta fluorescente o un anticuerpo primario etiquetado en enzima, que se puede visualizar sin interacción de anticuerpo adicional. En un ensayo típico indirecto, el anticuerpo primario no conjugado se une al antígeno y luego un anticuerpo segundario etiquetado se une al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo segundario se conjuga con una etiqueta enzimática, se agrega un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar la visualización del antígeno. La amplificación de señal ocurre debido a que varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítopos en el anticuerpo primario. El anticuerpo primario y/o secundario utilizado para inmunohistoquímica se etiquetara típicamente con un grupo funcional detectable.

[00359] a pesar de los procedimientos de preparación de muestras discutidas anteriormente, el tratamiento adicional de la sección de tejido antes de, durante y luego del IHC puede ser deseable. Por ejemplo, métodos de recuperación de epítopo, tal como el calentamiento de la muestra de tejido en amortiguador de citrato se puede llevar a cabo (ver, por ejemplo, Leong et al. Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996)).

310

[00360] Luego de una etapa de bloqueo opcional, la sección de tejido se expone a anticuerpo primario durante un periodo suficiente y bajo condiciones adecuadas de tal manera que el anticuerpo primario se une al antígeno de proteína objetivo en la muestra de tejido. Las condiciones apropiadas para alcanzar esto se pueden determinar mediante experimentación de rutina. El grado de unión del anticuerpo a la muestra se determina al utilizan una cualquiera de las etiquetas detectable discutidas anteriormente. Preferiblemente, la etiqueta es una etiqueta enzimática (por ejemplo, HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico sustrato tal como el cromogen 3,3'-diaminobenzidina. Preferiblemente la etiqueta enzimática se conjuga con un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es anticuerpo anti-conejo de cabra).

[00361] Los especímenes así preparados se puede montar y cubrir con un porta objetos. La evaluación del portaobjeto se determina luego, por ejemplo, utilizando un microscopio, y criterio de intensidad de teñido, que se puede emplear de manera rutinaria en la técnica para evaluar el criterio de intensidad de teñido como sigue:

TABLA 2

Patrón de teñido	**Clasificación**
No se observa teñido en las células	0
Se detecta teñido escasamente perceptible en más de 10% de las células	1+
Se observa teñido débil a moderado en más de 10% de las células	2+
Se observa teñido moderado a fuerte en más de 10% de las	3+

células	

[00362] Típicamente, una clasificación de patrón de teñido de aproximadamente 2+ o más en un ensayo IHC es diagnóstico y/o pronóstico. En algunas realizaciones, una clasificación de patrones de teñido de aproximadamente 1+ o más es diagnóstico y/o pronóstico. V, una clasificación de patrón de teñido de aproximadamente 3 o más es diagnóstico y/o pronóstico. Se entiende que cuando las células y/o tejido de un tumor o adenoma de colon se examinan utilizando IHC, el teñido se determina generalmente o evalúa en células de tumor y/o tejido (opuesto al tejido circundante o estromal que puede estar presente en la muestra).

[00363] Otros métodos de ensayos, conocidos como ensayos de captación o competitivos, se establecen bien y se utilizan ampliamente en la industria de diagnóstico comercial.

[00364] Los ensayos competitivos se basan en la capacidad de un trazador análogo VEGF para competir con la muestra de prueba VEGF para un número limitado de sitios de unión antígeno anticuerpo anti-VEGF. El anticuerpo anti-VEGF generalmente se insolubiliza antes o después de la terminación y luego el trazador y VEGF unidos al anticuerpo anti-VEGF se separan del trazador no unido y el VEGF. Esta separación se logra al decantar (cuando el socio de unión se preinsolubiliza) o al centrifugar (cuando el socio de unión se precipita después de reacción competitiva). La cantidad de muestra de prueba VEGF es inversamente proporcional a la cantidad de trazador unido según se mide por la cantidad de sustancia marcadora. Las curvas de respuestas de dosis con cantidades conocidas de VEGF se preparan y comparan con los resultados de prueba para determinar cuantitativamente la cantidad de VEGF presente en la muestra de

312

prueba. Estos ensayos se denominan Sistemas ELISA cuando se utilizan enzimas como marcadores detectables.

[00365] Otra especie de ensayo competitivo, denominado ensayo "homogéneo", no requiere una separación de fase. Aquí, un conjugado de una enzima con el VEGF seis prepara y utiliza de tal manera que anticuerpo anti-VEGF se une al VEGF en la presencia del anticuerpo anti-VEGF que modifica la actividad de enzima. En este caso, el VEGF o sus fragmentos inmunológicamente activos se conjugan con un puente orgánico bifuncional a una enzima tal como peroxidasa. Los conjugados se seleccionan para uso con el anticuerpo anti-VEGF de tal manera que la unión del anticuerpo anti-VEGF inhibe o potencia la actividad de enzima de la etiqueta. Este método per se es ampliamente practicado bajo el nombre de EMIT.

[00366] Se Utilizan conjugados estéricos en métodos de obstáculo estéricos para ensayo homogéneo. Estos conjugados se sintetizan al ligar covalentemente un hapteno de bajo peso molecular con un fragmento VEGF de tal manera que el anticuerpo al hapteno es incapaz sustancialmente de unir el conjugado al mismo tiempo que el anticuerpo anti-VEGF. De acuerdo con este procedimiento de ensayo el VEGF presente en la muestra de prueba unirá el anticuerpo anti-VEGF, permitiendo por lo tanto que el anti-hapteno se una tal conjugado, lo que resulta en un cambio en el carácter del hapteno conjugado, por ejemplo, un cambio en la fluorescencia cuando el hapteno es un fluoróforo.

[00367] Los ensayos de captación son particularmente útiles para la determinación de anticuerpos VEGF o anti-VEGF. En ensayo de captación secuencial se utiliza un anticuerpo anti- VEGF inmovilizado para adsorber la muestra de prueba VEGF,

la muestra de prueba se remueve mediante lavado, el VEGF unido se utiliza para adsorber un segundo anticuerpo anti-VEGF etiquetado y el material unido se separa luego del trazador residual. La cantidad de trazador unido es directamente proporcional a la muestra de prueba VEGF. En ensayo de captación "simultáneos" la muestra de prueba no se separa antes de agregar el anti-VEGF etiquetado. Un ensayo de captación secuencial utilizando un anticuerpo monoclonal anti-VEGF como el anticuerpo y un anticuerpo anti-VEGF policlonal como el otro es útil en muestras de prueba para VEGF.

[00368] Los anteriores son ensayos de detección únicamente de ejemplo para VEGF. Otros métodos se desarrollan ahora que utilizan anticuerpo anti-VEGF para la determinación de VEGF que se incluyen dentro del alcance de ésta.

[00369] Se entiende que cualquiera de las realizaciones de diagnóstico anteriores o de detección se pueden llevar a cabo utilizando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o en adición a un anticuerpo anti-VEGF.

Artículos de fabricación

[00370] En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o inserto de paquete en o asociado con el contenedor. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, etc. Los contenedores se pueden formar a partir de una variedad de materiales tal como vidrio o plástico. El contenedor aloja una composición que es en sí misma combinada con otra composición efectiva para tratar, prevenir y/o diagnosticar la

afección y puede tener un puerto de acceso (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco que tiene un tapón perforable por una aguja para inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención. La etiqueta o inserto de paquete indica que la composición se utiliza para tratar la afección de elección. Más aún, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida allí, en donde la composición comprende un anticuerpo o immunoconjugado de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición

Contenida allí, en donde la composición comprende un agente terapéutico citotóxico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un inserto de paquete que indica que la composición se puede utilizar para tratar una afección particular. Alternativamente, o adicionalmente, el articulo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo recipiente (o tercero) que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacterioestática para inyección (BWFI), salina amortiguada con fosfato-, solución de Ringer's y solución de dextrosa. Esta puede incluir adicionalmente otros materiales deseables a partir de un punto de vista comercial y de usuario. Que incluyen otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

[00371] Los siguientes ejemplos están destinados únicamente a ilustrar la práctica de la presente invención que no se proporcionan por vía de limitación. La descripción de todas las patentes y bibliografías científicas citada aquí se incorpora expresamente en su totalidad como referencia.

EJEMPLOS

315

Ejemplo 1

Generación y caracterización de anticuerpo anti-VEGF

[00372] Las colecciones de anticuerpo de fago sintéticas se constituyen en una única estructura (anticuerpo anti-ErbB2 humanizado, 4D5) al introducir diversidad dentro de las regiones que determinan la complementariedad (CDR) de cadenas ligeras y pesadas (Lee, C. v. et al. JMol Biol 340, 1073-93 (2004)). En resumen, las colecciones de anticuerpo sintético que presentan fago se constituyen en una única estructura humana al introducir la diversidad sintética en posiciones expuestas de solvente dentro de las regiones que determinan complementariedad de cadena pesada s (CDR). Para mejorar el desempeño de las colecciones, las colecciones de fragmento de unión a antígeno monovalentes y bivalentes (Fab) se construyen, y exploran diferente diversidad CDR-H3 al variar la composición de aminoácido y la longitud CDR. La colección se expande luego al incrementar la variabilidad de la longitud CDR-H3 y utilizando codones dirigidos que imitan la composición de aminoácido de las secuencias CDR-H3 naturales. Utilizando estas colecciones con CDR completamente sintético presentadas en un único andamio se genera anticuerpos de alta afinidad. Para detalles adicionales de estrategias y métodos para generar colecciones de anticuerpo sintéticos con única plantilla, ver, por ejemplo, la WO 2005/012359 publicado en Febrero 10, 2005, cuya descripción completa se incorpora expresamente aquí como referencia.

[00373] El paneo de la fase de solución con colecciones neófitas se desarrolla contra VEGF de murino biotinilizado en solución y luego capturado mediante 5ug/ml de neutravidina inmovilizada en inmunoplacas MaxiSorp™. Después de tres rondas de selección con concentración reducida de VEGF murino biotinilizado, los clones se seleccionan aleatoriamente y se identifican aglutinantes

específicos utilizando ELISA fago. Para cada clon de fago positivo, las regiones variables de cadenas ligeras y pesadas se subclonan en vectores de expresión pRK que se construyen con ingeniería para expresar cadena IgG de longitud completa. Las construcciones de cadena pesada y cadena ligera se co-transfectan en células CHO o 293, y los anticuerpos expresados se purifican a partir de medio libre de suero utilizando columna de afinidad de proteína A. para la maduración por afinidad, las colecciones de fago con diferente combinación de bucles CDR (CDR-HI y H2, CDR-LI, L2 y L3) derivados del clon inicial de interés se construye mediante estrategia de aletorización suave de tal manera que cada posición seleccionada se muta a un residuo tipo diferente al natural o se mantiene como de tipo natural en aproximadamente en una frecuencia 50:50 (Lee, C. vet al, Blood, 108:3103-31 11, 2006). Luego se identifican clones de alta afinidad a través de cuatro rondas de paneo de fase de solución contra VEGF humano biotinilado como se describe. La concentración de antígeno biotinilado decreciente permite más rigurosidad en el paneo.

Ejemplo 2

Afinidades de unión de anticuerpo anti-VEGF

[00374] Para determinar las afinidades de unión los IgG anti -VEGF, se utiliza la medición por resonancia de plasmón de superficie (SRP) con un instrumento BIAcore™-3000. Se activan chips biosensores de dextran carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con N-etil-N'- (3-dimetilaminopropil)-clorohidrato de carbodiimida (EDC) y N- hidroxisuccinimida (VHS) de acuerdo con las intrusiones del proveedor. Se inmoviliza el VEGF humano o de murino para lograr aproximadamente 60 unidades de respuesta (RU) de la proteína acoplada. Ver Figura 10. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en series de dos de

317

IgG anti-VEGF (7.8 nM a 500 nM) se inyecta por separado en amortiguador PBT (PBS con 0.05% (v/v) Tween 20) a 37°C con un índice de flujo de 25 µl/min. Los índices de asociación (Jc0n) e índices de disociación (k_{off}) se calcula un modelo de unión bivalente (Software de Evaluación BIAcore versión 3.2). La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como la relación kon/kon.

[00375] Debido al índice off no medible de B20.4.1, el IgG se inmoviliza para lograr aproximadamente 1000 unidades de respuestas (RU) de proteína acoplada. Ver Figura 11. Diluciones en series de dos de VEGF humano o de murino (7.8nM a 500nM) se inyecta en amortiguador PBT (PBS con 0.05% (v/v) Tween 20) a 37°C con un índice de flujo de 25µl/min. Los índices de asociación (kon) e índices de disociación (k_{Off}) se calcula utilizando un modelo de unión uno a uno Langmuir (Software de Evaluación BIAcore versión 3.2). Para obtener la constante de disociación de equilibrio (K_d).

Ejemplo 3

Ensayo de incorporación de timidina HUVEC

[00376] Para estudiar la función de los anticuerpos anti- VEGF al inhibir la proliferación celular inducida por VEGF, se desarrollan el ensayo de incorporación de timidina HUVEC. Se hacen crecer y se ensayan células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (Clontech, Mountain view, CA) como se describió. Se colocan en places aproximadamente 3000 HUVEC en cada pozo de una placa de cultivo de 96 pozo y se incuban en un medio Eagle's modificado Dulbecco's (DMEM)/F12 complementado con 1.5% (v/v) de suero bovino fetal (medio de ensayo) durante 18 horas. El medio de ensayo frescos con cantidades fijas de VEGF humano (concentración final 0.1 nM), se determina primero al titriar VEGF

318

que puede estimular la síntesis de ADN submáxima, e incrementar las concentraciones de IgG anti- VEGF que se agregan luego a la célula. Después de incubación a 37°C durante 18 horas, se pulsan las células con 0.5 µCi/pozo de [^{3}H] timidina durante 24 horas y se cosechan para conteo con contador de centelleo de microplaca TopCount como se describió.

[00377] El ensayo de incorporación de timidina HUVEC muestra que las variantes B20 pueden inhibir efectivamente la proliferación de células HUVEC. La Figura 12 muestra que el B20-4.1.1 y B20-4.1.1 RR tienen similar inhibición con G6-31.

Ejemplo 4

Ensayo de proliferación celular Endotelial

[00378] Para determinar la especificad de unión y la actividad de bloqueo de B20-4.1.1, se desarrolla un ensayo basado en una célula utilizando células endoteliales microvasculares retínales de bovino (BRME), en donde el anticuerpo se prueba por su capacidad para bloquear la proliferación de células inducidas VEGF humano o de murino. BRME se siembra a una densidad de 500 células/pozos en 96-pozos en medio de creciente (DMEM de baja -glucosa complementado con 10% de suero de becerro, 2 mM de glutamina, y antibióticos). Para ensayo de inhibición, el B20-4.1.1 se agrega en la concentración indicada (ng/ml) a pozos por triplicado (Figura 13). Después de 0.5 horas, VEGF-A humanos (h VEGF) o VEGF-A (mVEGF) de ratón se agrega a una concentración final de 6 ng/ml. Después de seis o siete días, se determina el crecimiento celular mediante azul Alamar (BioSource; Invitrogen). La Fluorescencia se monitorea en longitud de onda de excitación de 530 nm y 590 nm de longitud de onda de emisión.

319

[00379] como se muestra en la Figura 13, el B20-4.1.1 reduce la capacidad del hVEGF y el mVEGF para promover la proliferación BRME. Como se muestra en la Figura 16, el anticuerpo avastina reduce la capacidad del hVEGF para promover la proliferación BRME. El anticuerpo avastina no inhibe la proliferación producida por mVEGF ya que la inhibición de mVEGF no se observa una concentración de hasta 1500 nM de anticuerpo avastina.

Ejemplo 5

Estudios in vivo de Inhibición de tumor

[00380] Células A549 (células de cáncer de pulmón humano) y células MDA-MB231 (células de cáncer de mama humano) se hacen crecer en medio de cultivo celular y se inyectan subcutáneamente en ratones sin pelo beige de 8- a 12-semanas de de vida en una densidad células de ~ 5 x 106 células/ratón. Cuarenta y ocho horas después de la inoculación de las células de tumor o cuando el tumor alcanza aproximadamente 200 mm^3 de tamaño, se inyectan ratones (n=10) intraperitonealmente con B20-4.1.1 a una concentración de 5 mg/kg o con amortiguador de vehículo. Los anticuerpos se administran dos veces semanalmente después. Se mide el volumen de tumor con calibradores en los momentos de tiempo indicado.

[00381] Como se muestra en las Figuras 14 y 15, el B20-4.1.1 es efectivo en reducir volúmenes de tumor en ratones inyectados con células A549 (Figura 14) o células MDA- MB231 (Figura 15).

[00382] aunque en la anterior descripción se ilustra la invención con referencia a ciertas realizaciones, esta no se limita a ellas. De hecho, varias modificaciones de la invención en adición a aquellas mostradas y descritas aquí serán evidentes para

320

aquellos expertos en la técnica a partir de la anterior descripción y caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

321

REIVINDICACIONES

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un anticuerpo (VEGF) de factor de crecimiento endotelial anti-vascular aislado en donde el anticuerpo comprende seis HVR seleccionados de:

(i) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de X_1X_2R X_3SL en donde el HVR-L1 comprende 1, 2 o 3 sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: X_1 es G o A; X_2 es V o I; y/o X_3 es T o R;

(ii) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de DASSLA (SEQ ID NO:6);

(iii) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SYKSPL (SEQ ID NO:7);

(iv) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SISGSWIF (SEQ ID NO: 1);

(v) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de GAIWPFGGYTH (SEQ ID NO:2).; y

(vi) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de RWGHSTSPWAMDY (SEQ ID NO:3).

322

2. Un anticuerpo anti-VEGF aislado, en donde el anticuerpo comprende:

(1) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:1 ;

(2) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:2;

(3) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:3

(4) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:4;

(5) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:6; y

(6) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:7.

3. Un anticuerpo anti-VEGF aislado, en donde el anticuerpo comprende:

(1) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1;

(2) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:2;

(3) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:3

(4) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 5;

(5) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:6; y

(6) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:7.

323

4. Un anticuerpo anti-VEGF aislado, en donde el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44 o 45.

5. Un anticuerpo anti-VEGF aislado en donde el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44 o 45.

6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44.

7. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:45.

8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo es humanizado.

10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo es humano.

11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde por lo menos una porción de la secuencia de estructura es una secuencia de estructura consensus humana.

12. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

13. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 12.

14. El vector de la reivindicación 13, en donde el vector es un vector de expresión.

15. Una célula anfitriona que comprende el vector de la reivindicación 13 o 14.

16. La célula anfitriona de la reivindicación 15, en donde la célula anfitriona es procariótica.

17. La célula anfitriona de la reivindicación 15, en donde la célula anfitriona es eucariótica.

18. La célula anfitriona de la reivindicación 15, en donde la célula anfitriona es de mamífero.

19. Un método para elaborar un anticuerpo anti-VEGF, dicho método comprende (a) expresar el vector de la reivindicación 14 en una célula de anfitriona adecuada, y (b) recuperar el anticuerpo.

20. Un método para elaborar un inmunoconjugado anti-VEGF, dicho método comprende (a) expresar el vector de la reivindicación 14 en una célula de anfitriona adecuada, y (b) recuperar el anticuerpo.

21. El método de la reivindicación 19 o 20, en donde la célula anfitriona es procariótica.

22. El método de la reivindicación 19 o 20, en donde la célula anfitriona es eucariótica.

23. Una composición que comprende el anticuerpo anti-VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

24. Una composición que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 12-14.

25. La composición de la reivindicación 23 o 24, en donde la composición comprende adicionalmente un portador.

26. Un método para la detección de VEGF, el método comprende detectar El complejo de anticuerpo VEGF-anti-VEGF en una muestra biológica en donde la secuencia de aminoácido del anticuerpo anti-VEGF comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 44 o 45.

326

27. El método de la reivindicación 26 en donde la secuencia de aminoácido del anticuerpo anti-VEGF comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44.

28. El método de la reivindicación 26 en donde la secuencia de aminoácido del anticuerpo anti-VEGF comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:43, y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:45.

29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 26-28, en donde el anticuerpo anti-VEGF se marca detectablemente.

30. Un método para tratar un tumor, cáncer, o trastorno proliferativo de célula que comprende administrar una cantidad efectiva del anticuerpo anti-VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 a un sujeto en necesidad de tal tratamiento, por lo que se trata el tumor, cáncer o trastorno proliferativo de célula.

31. El método de la reivindicación 30, en donde el sujeto es humano.

32. El método de la reivindicación 30, en donde el tumor, cáncer, o trastorno proliferativo de célula es cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, o glioblastoma.

33. Un método para inhibir angiogenia en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo anti-VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

34. Un método para inhibir permeabilidad vascular que comprende administrar a un sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo anti-VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

328

ANTICUERPOS ANTI-VEGF

RESUMEN

La invención aquí proporciona anticuerpos aislados que unen al VEGF. La invención proporciona adicionalmente métodos para elaborar anticuerpos anti-VEGF, y polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-VEGF.

Clon #	H1							
	28	29	30	31	32	33	34	35
B20-4.1.1	S	I	S	G	S	W	I	F
B20-4.1.1RR	S	I	S	G	S	W	I	F

SEQ ID NO.: 1

Clon #	H2										
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58
B20-4.1.1	G	A	I	W	P	F	G	G	Y	T	H
B20-4.1.1RR	G	A	I	W	P	F	G	G	Y	T	H

SEQ ID NO.: 2

Clon #	H3												
	94	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	101	102
B20-4.1.1	R	W	G	H	S	T	S	P	W	A	M	D	Y
B20-4.1.1RR	R	W	G	H	S	T	S	P	W	A	M	D	Y

SEQ ID NO.: 3

Clon #	L1					
	28	29	30	31	32	33
B20-4.1.1	G	V	R	T	S	L
B20-4.1.1RR	A	I	R	R	S	L

SEQ ID NO.: 4
SEQ ID NO.: 5

Clon #	L2					
	50	51	52	53	54	55
B20-4.1.1	D	A	S	S	L	A
B20-4.1.1RR	D	A	S	S	L	A

SEQ ID NO.: 6

Clon #	L3					
	91	92	93	94	95	96
B20-4.1.1	S	Y	K	S	P	L
B20-4.1.1RR	S	Y	K	S	P	L

SEQ ID NO.: 7

FIG. 1

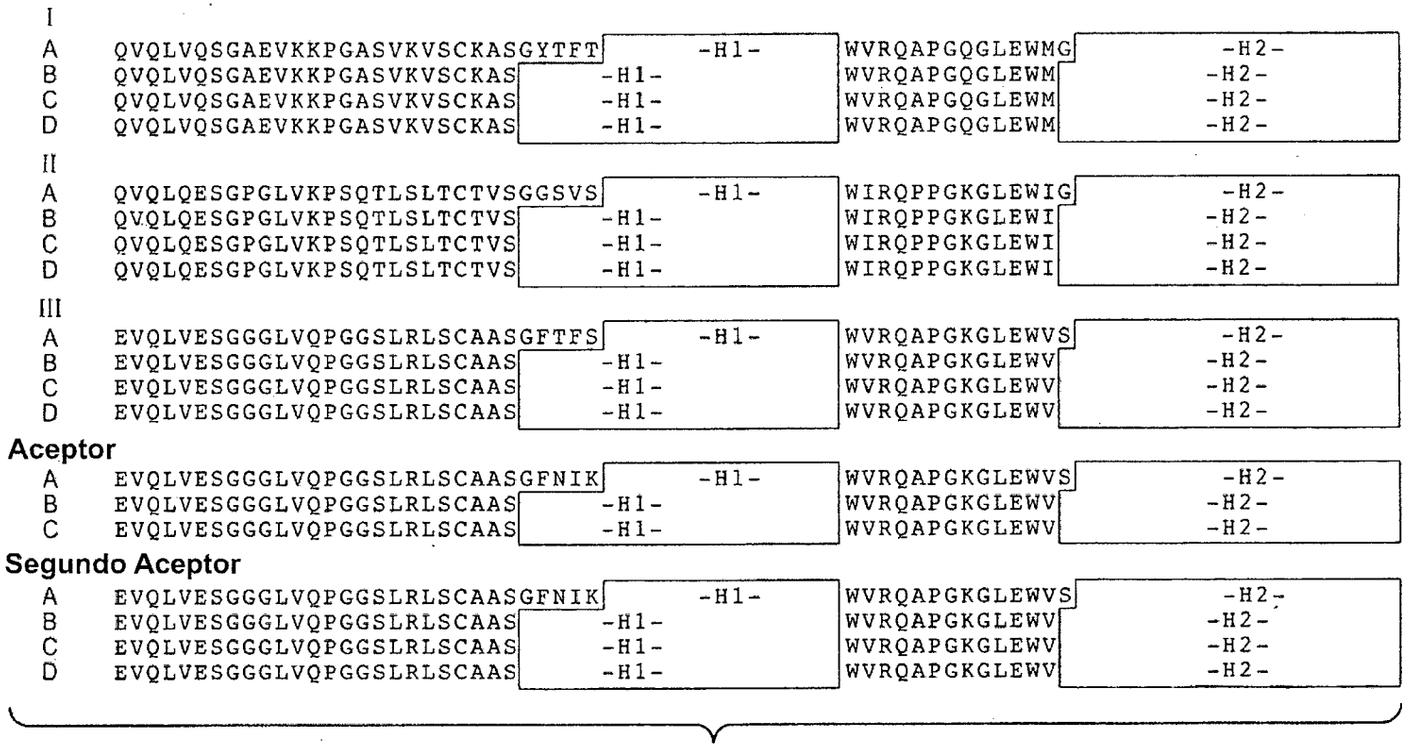

I
A QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT -H1- WVRQAPGQGLEWMG -H2-
B QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2-
C QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2-
D QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2-
II
A QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSVS -H1- WIRQPPGKGLEWIG -H2-
B QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2-
C QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2-
D QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2-
III
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
Aceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
Segundo Aceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-

FIG. 2A

630


I
A RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 8
B RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 9
C RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 10
D RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 11
II
A RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 12
B RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 13
C RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 14
D RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 15
III
A RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 16
B RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 17
C RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 18
D RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 19
Aceptor
A RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 20
B RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 21
C RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 22
Segundo Aceptor
A RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 23
B RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 24
C RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 25
D RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 26

FIG. 2B

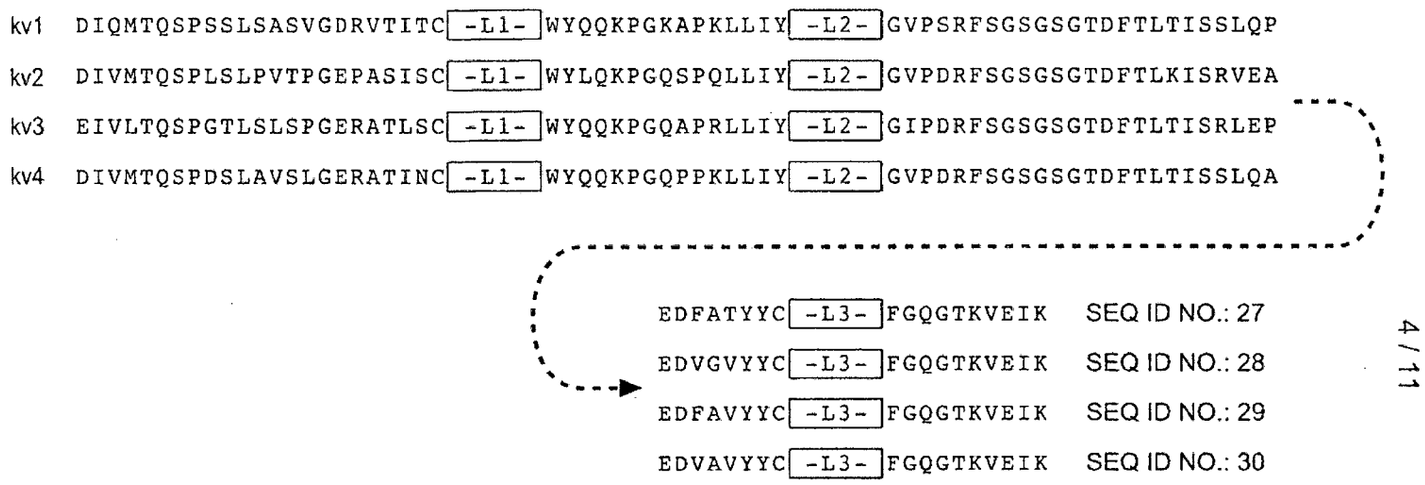

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
kv2 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA
kv3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
kv4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA
EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 27
EDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 28
EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 29
EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 30

FIG. 3

Secuencias de Estructura de huMAb4D5-8 de Cadena Pesada

HC-FR1 ^{1}Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser^{25} (SEQ ID NO: 31)

HC-FR2 ^{36}Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val^{48} (SEQ ID NO: 32)

HC-FR3 ^{66}Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn^{82a} Ser^{82b} Leu^{82c} Arg^{83} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys^{92} (SEQ ID NO: 33)

HC-FR4 ^{103}Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser^{113} (SEQ ID NO: 34)

Secuencias de Estructura de huMAb4D5-8 de Cadena Ligera

LC-FR1 ^{1}Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys^{23} (SEQ ID NO: 35)

LC-FR2 ^{35}Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr^{49} (SEQ ID NO: 36)

LC-FR3 ^{57}Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys^{88} (SEQ ID NO: 37)

LC-FR4 ^{98}Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys^{107} (SEQ ID NO: 38)

FIG. 4

Secuencias de Estructura de huMAb4D5-8 de Cadena Pesada Modificada en las Posiciones 71, 73 y 78 (subrayadas)

HC-FR1 ^{1}Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser^{25} (SEQ ID NO: 31)

HC-FR2 ^{36}Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val^{48} (SEQ ID NO: 32)

HC-FR3 ^{66}Arg Phe Thr Ile Ser <u>Arg</u> Asp <u>Asn</u> Ser Lys Asn Thr <u>Leu</u> Tyr Leu Gln Met Asn^{82a} Ser^{82b} Leu^{82c} Arg^{83} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys^{92} (SEQ ID NO: 42)

HC-FR4 ^{103}Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser^{113} (SEQ ID NO: 34)

Secuencias de Estructura de huMAb4D5-8 de Cadena Ligera Modificada en la Posición 66 (subrayada)

LC-FR1 ^{1}Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys^{23} (SEQ ID NO: 35)

LC-FR2 ^{35}Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr^{49} (SEQ ID NO: 36)

LC-FR3 ^{57}Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser <u>Gly</u> Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys^{88} (SEQ ID NO: 41)

LC-FR4 ^{98}Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys^{107} (SEQ ID NO: 38)

FIG. 5

	CDR-L1						CDR-L2						CDR-L3					
Kabat No.	28	29	30	31	32	33	50	51	52	53	54	55	91	92	93	94	95	96
B20-4.1.1	G	V	R	T	S	L	D	A	S	S	L	A	S	Y	K	S	P	L
B20-4.1.1RR	A	I	R	R	S	L	D	A	S	S	L	A	S	Y	K	S	P	L

FIG. 6

	CDR-H1								CDR-H2										CDR-H3												
Kabat No.	28	29	30	31	32	33	34	35	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	94	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	101	102
B20-4.1.1	S	I	S	G	S	W	I	F	G	A	I	W	P	F	G	G	Y	T	H	R	W	G	H	S	T	S	P	W	A	M	D	Y
B20-4.1.1RR	S	I	S	G	S	W	I	F	G	A	I	W	P	F	G	G	Y	T	H	R	W	G	H	S	T	S	P	W	A	M	D	Y

FIG. 7

Anti-VEGF de Cadena Ligera

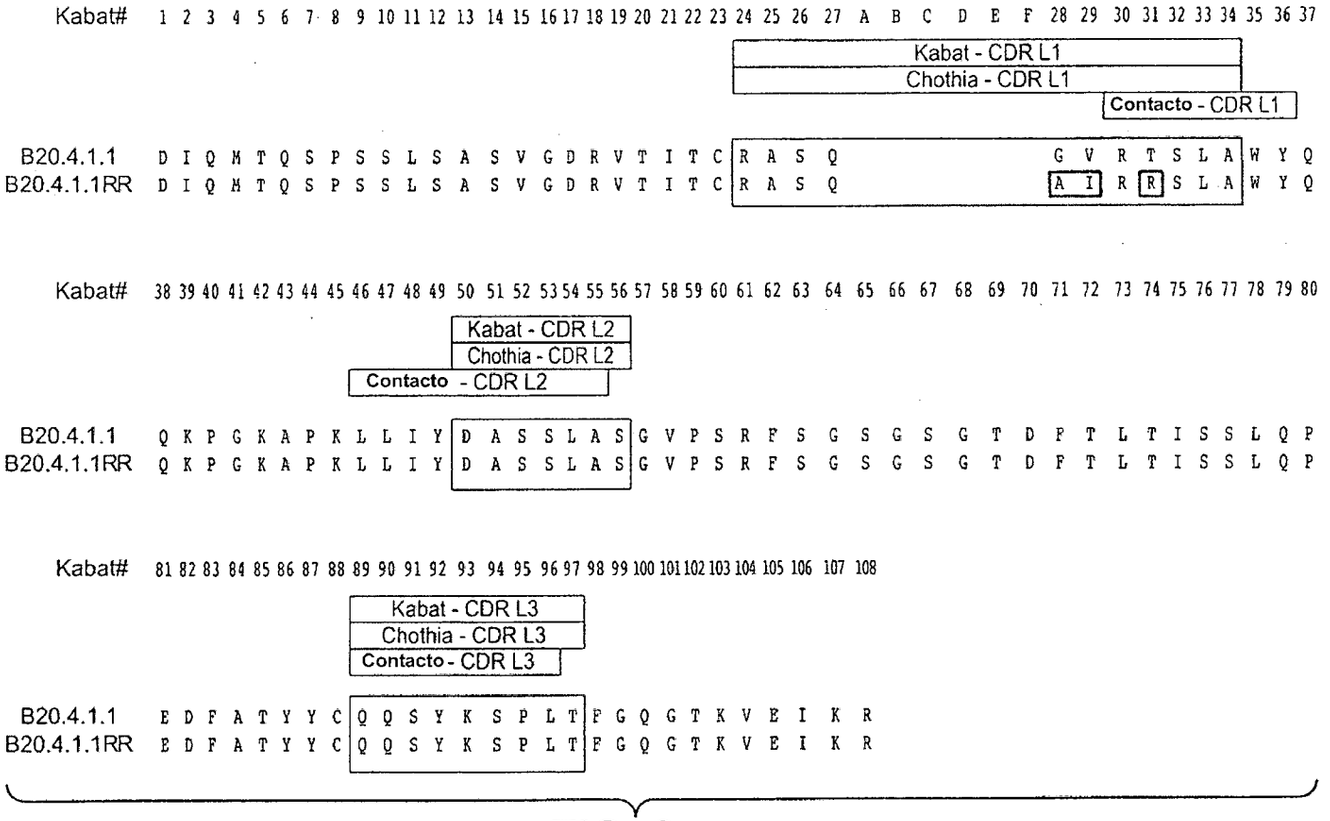


FIG. 8

Anti-VEGF de Cadena Pesada

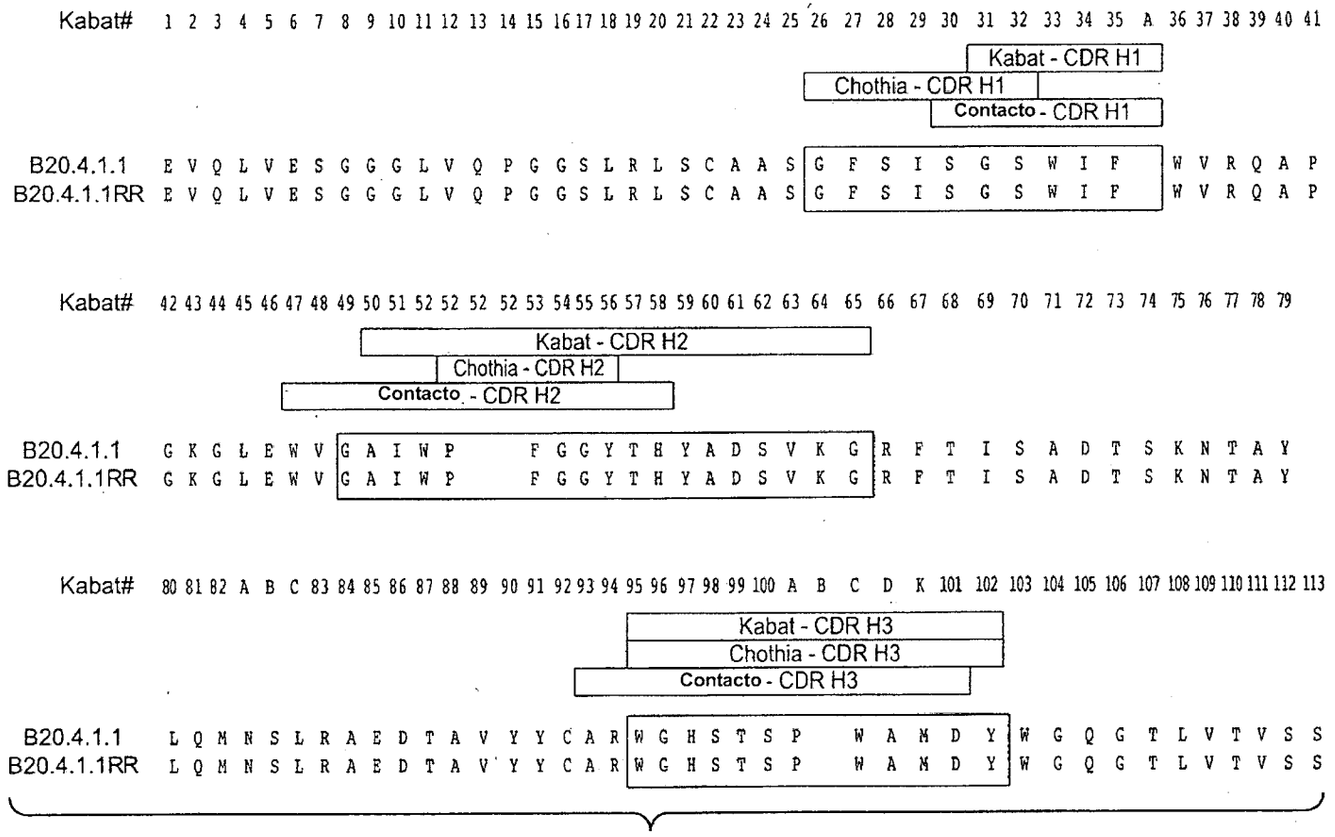


FIG. 9

37C	$k_{on}(x10^4)M^{-1}s^{-1}$		$k_{off}(x10^{-4})s^{-1}$		$Kd(k_{off}/k_{on})nM$	
IgG	hVEGF	mVEGF	hVEGF	mVEGF	**hVEGF**	**mVEGF**
B20.4.1	0.74	0.64	0.002	0.024	**0.02**	**0.37**
B20.4.1.1	7.1	5.59	5.94	5.66	**8.34**	**10.13**
B20.4.1.1RR	19.4	13.9	6.23	7.27	**3.21**	**5.23**

FIG. 10

37C	$k_{on}(x10^4)M^{-1}s^{-1}$		$k_{off}(x10^{-4})s^{-1}$		$Kd(k_{off}/k_{on})nM$	
IgG	hVEGF	mVEGF	hVEGF	mVEGF	**hVEGF**	**mVEGF**
B20.4.1	19.2	31.9	2.23	7.2	**1.16**	**2.26**
B20.4.1.1	57.1	33.1	9.68	7.91	**1.70**	**2.39**
B20.4.1.1RR	65.1	44.6	5.53	6.07	**0.85**	**1.36**

FIG. 11

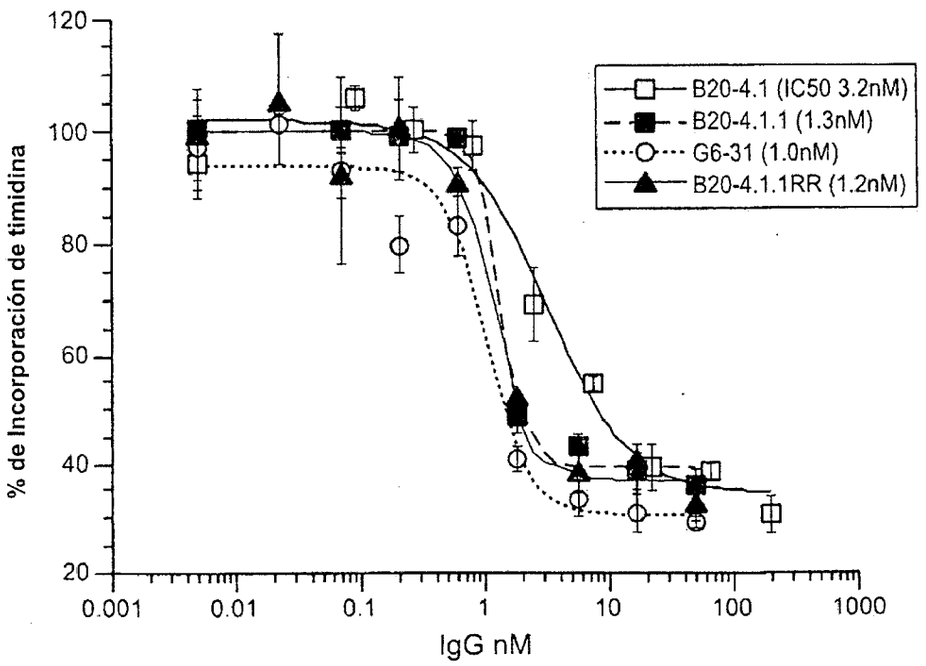


FIG. 12

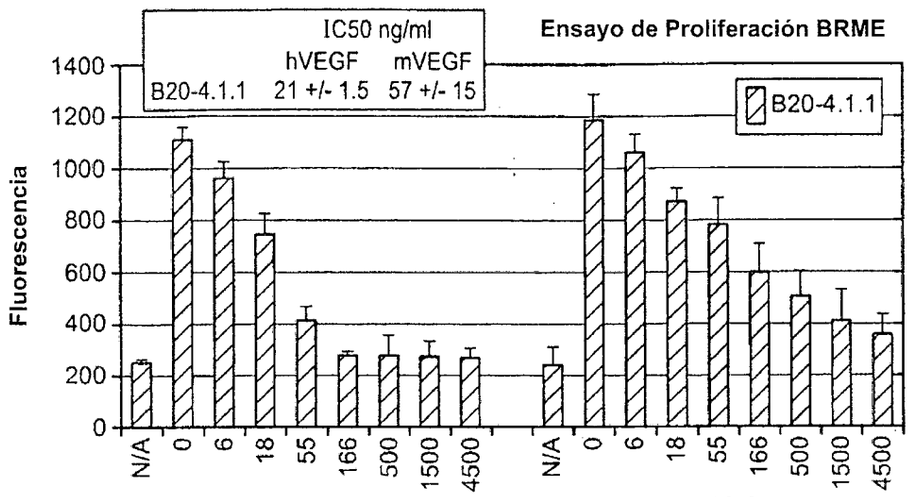

IC50 ng/ml
hVEGF mVEGF
B20-4.1.1 21 +/- 1.5 57 +/- 15
Ensayo de Proliferación BRME
B20-4.1.1
Fluorescencia
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
N/A
0
6
18
55
166
500
1500
4500
hVEGF
mVEGF

FIG. 13

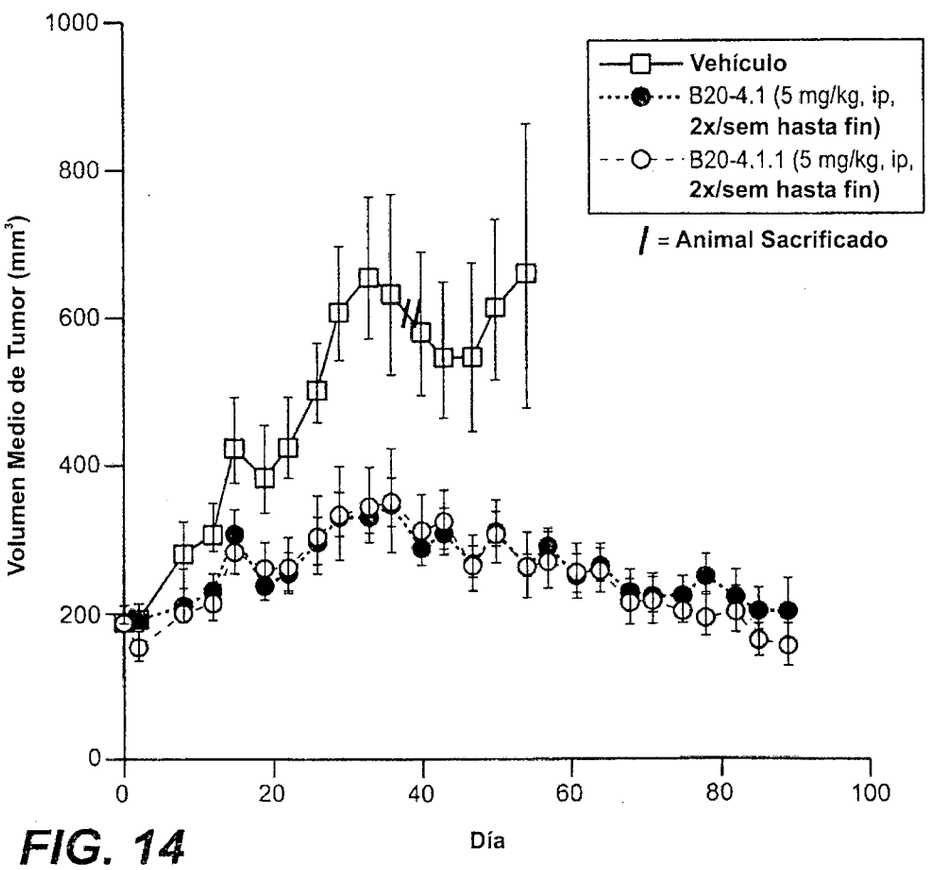

Vehículo
B20-4.1 (5 mg/kg, ip, 2x/sem hasta fin)
B20-4.1.1 (5 mg/kg, ip, 2x/sem hasta fin)
/ = Animal Sacrificado
Volumen Medio de Tumor (mm³)
1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
80
100
Día

FIG. 14

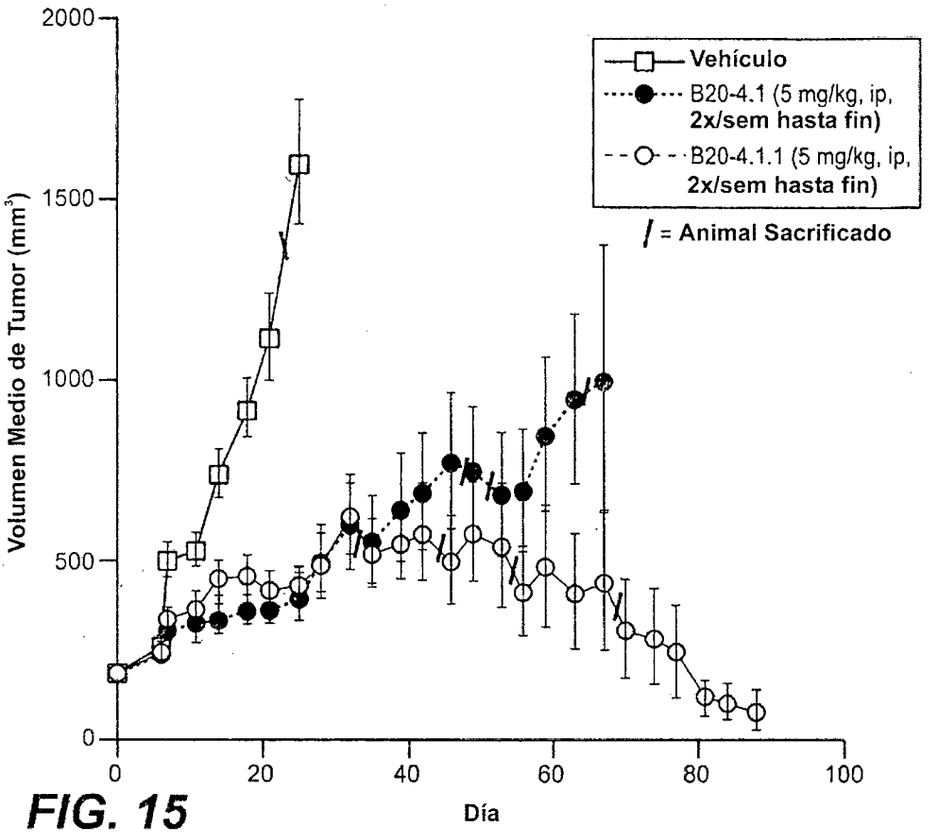

Vehículo
B20-4.1 (5 mg/kg, ip, 2x/sem hasta fin)
B20-4.1.1 (5 mg/kg, ip, 2x/sem hasta fin)
/ = Animal Sacrificado
Volumen Medio de Tumor (mm³)
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
80
100
Día

FIG. 15

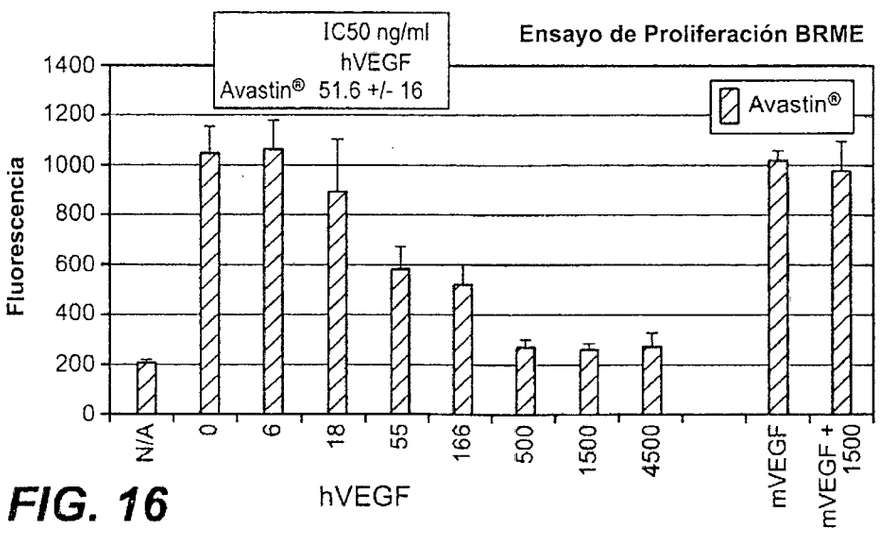

IC50 ng/ml
hVEGF
Avastin® 51.6 +/- 16
Ensayo de Proliferación BRME
Avastin®
Fluorescencia
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
N/A
0
6
18
55
166
500
1500
4500
mVEGF
mVEGF + 1500
hVEGF

FIG. 16

<110> Genentech, Inc.
Fuh, Germaine
Lee, Chingwei V.

<120> Anti-VEGF Antibodies

<130> 50474/021WO2

<150> 60/991,302
<151> 2007-11-30

<160> 45

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 1
Ser Ile Ser Gly Ser Trp Ile Phe
5

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 2
Gly Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His
5 10

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 3
Arg Trp Gly His Ser Thr Ser Pro Trp Ala Met Asp Tyr
5 10

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 4
Gly Val Arg Thr Ser Leu
5

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 5
Ala Ile Arg Arg Ser Leu
5

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 6
Asp Ala Ser Ser Leu Ala
5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 7
Ser Tyr Lys Ser Pro Leu
5

<210> 8
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 8
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

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

Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
50 55 60

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 9
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 9
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 10
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 10
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 11
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 11

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 12
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 12
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg
35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
50 55 60

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 13
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 13
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 14
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 14
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 15
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 15
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 16
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
50 55 60

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 17
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 17
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 18
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 18

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
             20                  25                  30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
             35                  40                  45

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
             50                  55                  60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
             65                  70                  75

Val Thr Val Ser Ser
             80
```

<210> 19
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 19

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
             20                  25                  30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
             35                  40                  45

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
             50                  55                  60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
             65                  70                  75

Thr Val Ser Ser
```

<210> 20
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 20

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
             20                  25                  30

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

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 21
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 21
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 22
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 22
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 23
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

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

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 24
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 24
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 25
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 25

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 26
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 27
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 27
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 28
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 28
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
1 5 10 15

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
50 55 60

Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 29
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 29
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
50 55 60

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 30
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 30
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60

Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 31
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 32
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 33
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 33

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 34
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 35
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 35
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 36
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 37
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 37
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 38
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 39
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 39
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 40
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys

<210> 41
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 41
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 42
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 42
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 43
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 43
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Ile Ser
20 25 30

Gly Ser Trp Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly His Ser Thr Ser Pro
95 100 105

Trp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
110 115 120

Ser

<210> 44
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 44
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Tyr Lys Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 45

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

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

Arg Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
            35                  40                  45

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
            50                  55                  60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
            65                  70                  75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
            80                  85                  90

Ser Tyr Lys Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
            95                  100                 105

Ile Lys Arg
```

35+

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/013248

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/00 C07K16/22 C07K16/32 A61K39/395 A61P35/00
C12N15/13

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/012359 A (GENENTECH INC [US]; FUH GERMAINE [US]; GERBER HANSPETER [US]; LIANG WE) 10 February 2005 (2005-02-10) cited in the application page 5, line 5 - line 24 page 7, line 12 - page 8, line 26 page 9, line 1 - page 10, line 22 page 14, line 35 - page 15, line 3 page 29, line 22 - page 49, line 3 figures 27-35 claims 1-69; examples 1-5,12	1-34
X	US 2007/020267 A1 (FUH GERMAINE [US] ET AL) 25 January 2007 (2007-01-25) cited in the application the whole document, especially examples 1-5,12 and figures 27-29	1-34

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 March 2009	23/03/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bayer, Annette

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/013248

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005012359 A	10-02-2005	AU 2004262006 A1	10-02-2005
		BR PI0412637 A	26-09-2006
		CA 2533297 A1	10-02-2005
		EP 1648939 A2	26-04-2006
		JP 2007526756 T	20-09-2007
		KR 20060067950 A	20-06-2006
		MX PA06001319 A	04-05-2006
		SG 145725 A1	29-09-2008
		US 2005106667 A1	19-05-2005
US 2007020267 A1	25-01-2007	US 2006280747 A1	14-12-2006
		US 2007141065 A1	21-06-2007

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:

22) Fecha de solicitud:

(30) Prioridad (31) *Prioridad* 60/991,302 (32) *Fecha* 30/11/2007 (33) *País* US

(51) Int Cl: C07K 016/000

(71)Solicitante(s) GENENTECH, INC.

(72) Inventor(es) GERMAINE FUH
CHINGWEI V. LEE

(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 30/06/2010
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 01/12/2008
No. de solicitud PCT/US2008/013248

(87) Publicación internacional
Fecha: 11/06/2009
N° publicación: *WO 2009/073160 A1*

(54) Titulo: **ANTICUERPOS ANTI-VEGF**

Reivindicación(es):

1. Un anticuerpo (VEGF) de factor de crecimiento endotelial anti-vascular aislado en donde el anticuerpo comprende seis HVR seleccionados de:

(i) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de X_1X_2R X_3SL en donde el HVR-L1 comprende 1, 2 o 3 sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: X_1 es G o A; X_2 es V o I; y/o X_3 es T o R;

(ii) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de DASSLA (SEQ ID NO:6);

(iii) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SYKSPL (SEQ ID NO:7);

(iv) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SISGSWIF (SEQ ID NO: 1);

(v) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de GAIWPFGGYTH (SEQ ID NO:2).; y

(vi) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de RWGHSTSPWAMDY (SEQ ID NO:3).

2. Un anticuerpo anti-VEGF aislado, en donde el anticuerpo comprende:

(1) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:1 ;

(2) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:2;

(3) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:3

(4) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:4;

(5) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:6; y

(6) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:7.

3. Un anticuerpo anti-VEGF aislado, en donde el anticuerpo comprende:

(1) un HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1;

(2) un HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:2;

(3) un HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:3

(4) un HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 5;

(5) un HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:6; y

(6) un HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:7.

4. Un anticuerpo anti-VEGF aislado, en donde el dominio variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:44 o 45.

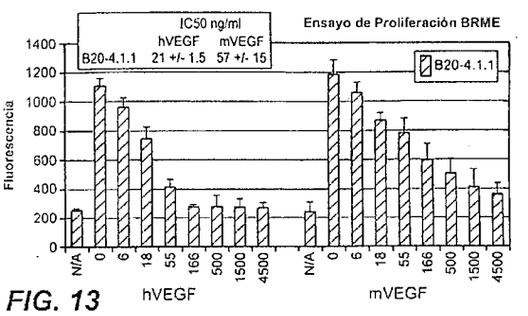


FIG. 13

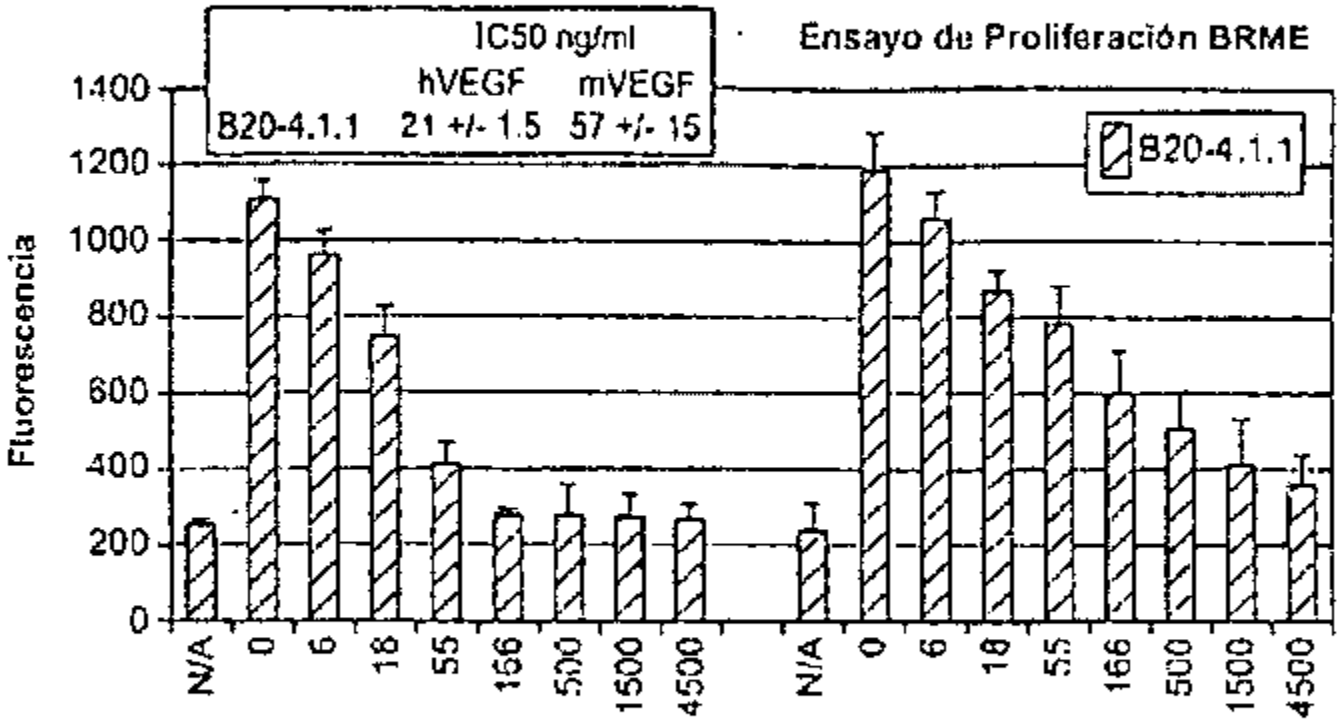

IC50 ng/ml
hVEGF
mVEGF
B20-4.1.1 21 +/- 1.5 57 +/- 15
Ensayo de Proliferación BRME
B20-4.1.1
Fluorescencia
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
N/A
0
6
18
55
156
500
1500
4500
N/A
0
6
18
55
166
500
1500
4500
hVEGF
mVEGF

FIG. 13

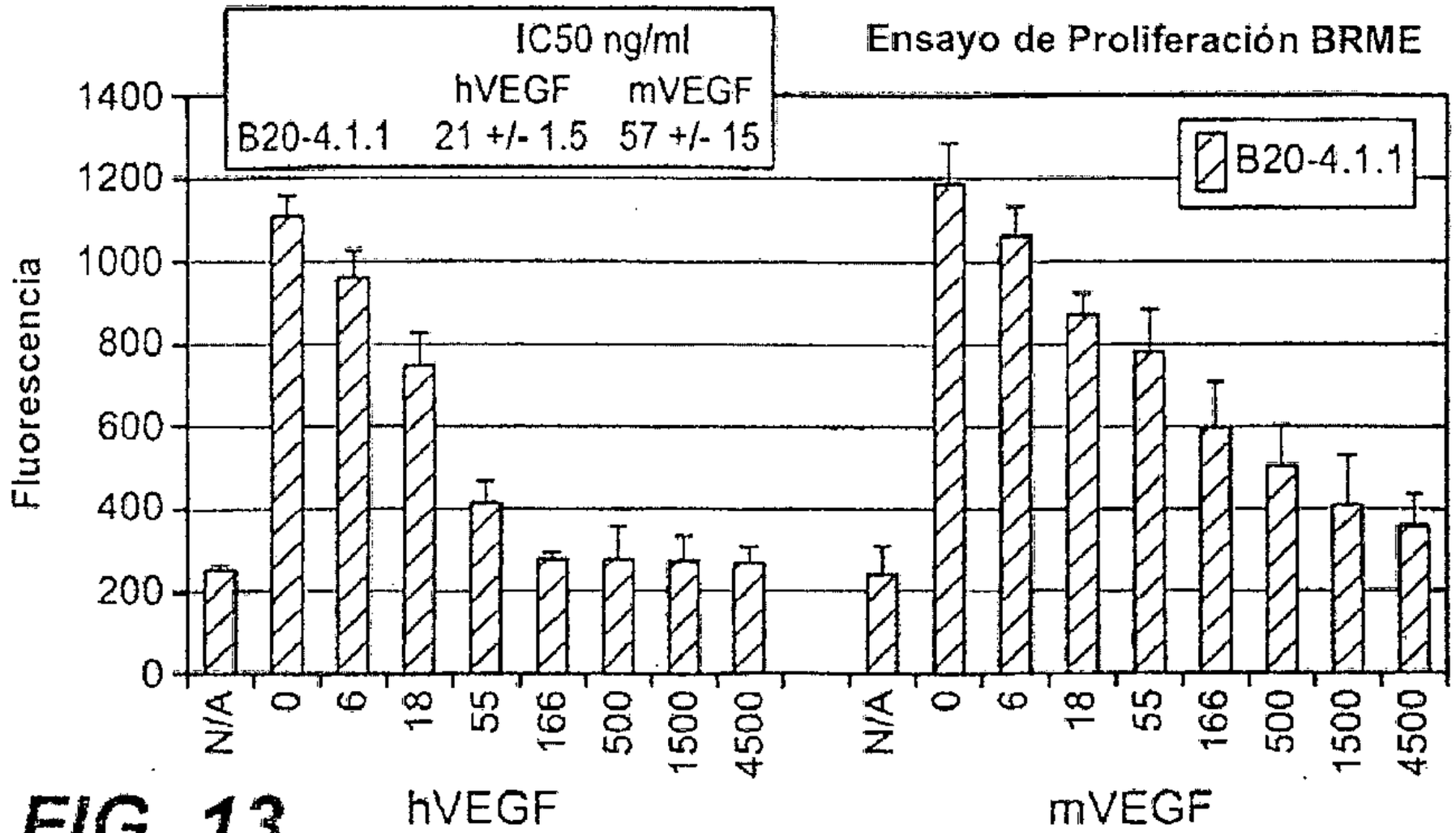

Ensayo de Proliferación BRME
IC50 ng/ml
hVEGF mVEGF
B20-4.1.1 21 +/- 1.5 57 +/- 15
B20-4.1.1
Fluorescencia
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
N/A
0
6
18
55
166
500
1500
4500
hVEGF
mVEGF

FIG. 13

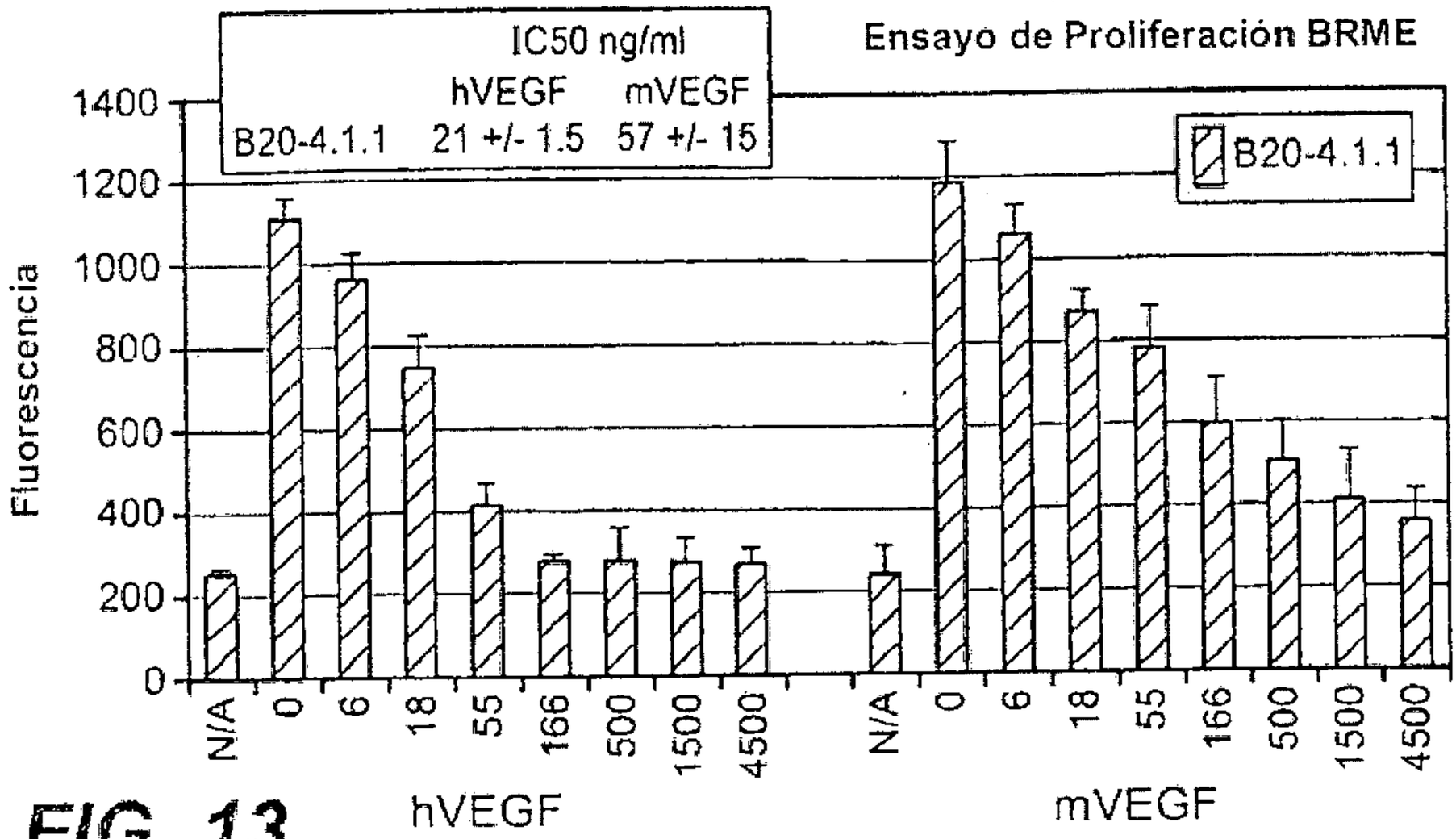

Ensayo de Proliferación BRME
IC50 ng/ml
hVEGF mVEGF
B20-4.1.1 21 +/- 1.5 57 +/- 15
B20-4.1.1
Fluorescencia
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
N/A
0
6
18
55
166
500
1500
4500
hVEGF
mVEGF

FIG. 13

361

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 46,665
FECHA : JUNIO 8 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-078672- -00000-0000
Fecha: 2010-06-29 17:50:53 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 362

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175542430	08/06/2010	39,560,000.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	90	INSCRIPCION DE RENUNCIA DE DERECH	280,000.00
			TOTAL : $	280,000.00

SON: DOSCIENTOS OCHENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Rdo 13563-841-002-1

362

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 30,000
FECHA : ABRIL 20 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-078672- -00000-0000
Fecha: 2010-06-29 17:50:53 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 362

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175527354	19/04/2010	56,517,000.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	*** TASA ANUAL C.RECARGO A#OS 13 a 16	900,000.00

****

TOTAL : $ 900,000.00

SON: NOVECIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Cdo 13563-841-002-1

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-078672- -00000-0000
Fecha: 2010-06-29 17:50:53 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 373 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 362

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐

- ☐ 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 INVENCIÓN 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 ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH, INC.

REFERENCIA	Radicación No.	10 078672
	Solicitud internacional	PCT/US2008/013248
	Fecha inicio fase nacional	30/06/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	№ 08957

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. El solicitante debe presentar un nuevo titulo que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el titulo relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

2. 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.

Continua en la página siguiente...

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

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 16 JUL. 2010.
adpa11

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5 , 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Cra 50 No. 26-55 int. 2 Tel: 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co