



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-112591- -00000-0000

21. EXPEDIENTE No. _____

Fecha: 2011-09-01 16:04:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 196

NUEVOS ANTICUERPOS Anti- $\alpha 5\beta 1$ Y SUS USOS

54. TITULO _____

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE GENENTECH, INC. _____

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA _____

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO _____

22. BOGOTÁ, D.C. _____

AS: 117.819	PETITORIO	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 11-112591-00000-0000 Fecha: 2011-09-01 16:04:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 196
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1	SOLICITUD DE:
☒ Patente de Invención.	☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo I.	☐ Capítulo II.

2	SOLICITANTE Nombre: GENENTECH, INC. Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América Lugar de Constitución: Estados Unidos de América Teléfono: Fax: E-mail:	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual Número _____
---	---	---

3	REPRESENTANTE O APODERADO Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Calle 70 A #4-41, Bogotá, Colombia. Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200 E-mail:	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual Número <u>80.410.337</u> TP <u>57492</u>
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de radicación (del poder).		

4	INVENTOR (ES) (72) Nombre: LIANG, Wei-Ching; PLOWMAN, Gregory, D.; WU, Yan; YE, Weilan. Dirección: 342 Menhaden Court, Foster City, CA 94404, Estados Unidos de América; 1386 Chestnut Street, San Carlos, CA 94070, Estados Unidos de América; 1160 Blythe Street, Foster City, CA 94404, Estados Unidos de América; 119 Barkentine Street, Foster City, CA 94404, Estados Unidos de América; respectivamente. Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América, respectivamente.
---	--

5 PCT (86)	Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2010/028291</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2010/111254</u> A9	Fecha <u>23.03.2010</u> Fecha <u>30.09.2010</u>
-------------------	--	--

6 Título (54):	<u>NUEVOS ANTICUERPOS Anti-α5β1 Y SUS USOS</u>
-----------------------	--

7 Clasificación Internacional (51):	_____
--	-------

8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>US</u>	(32) Fecha <u>25.03.2009</u>	(31) Número de Solicitud <u>61/163,241</u>
--	----------------------------------	---------------------------------	---

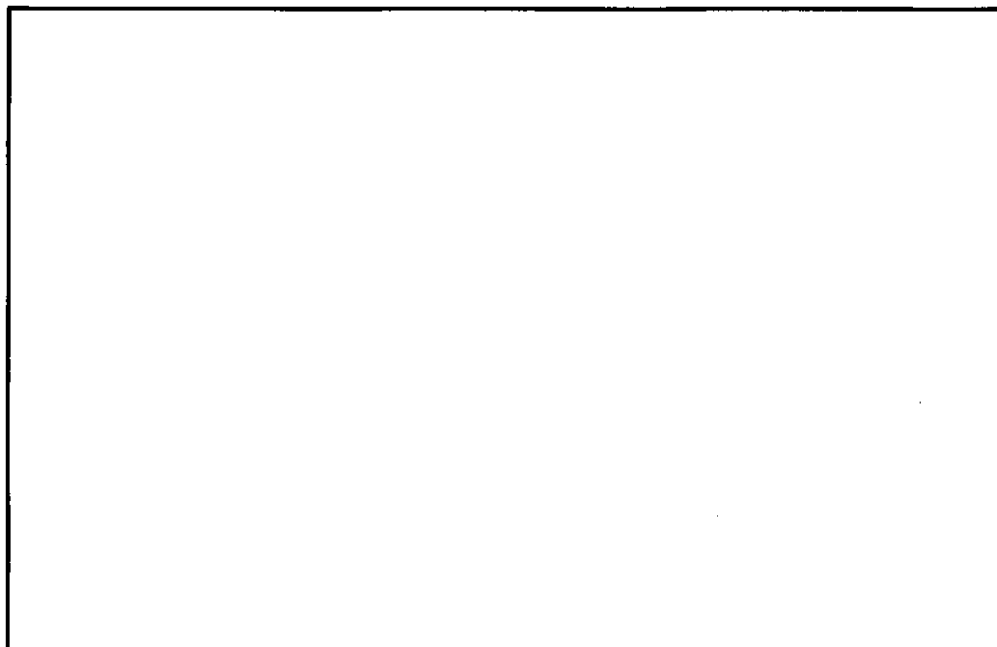
9 Comprobante de pago No. <u>11-67949-11-33051-11-58848-11-14426</u>	Fecha <u>03-08-2011</u>
---	--------------------------------

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 571.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no esté inscrita en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Fotocopia autenticada.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al español (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional bajo el Art. 34.
- ☒ Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales \$ 702.000 (26*\$27.000).

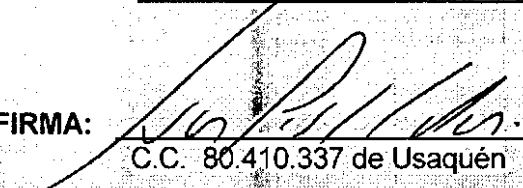
11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:



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

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

1178193

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0067949

Bogotá D.C., Julio 14 de 2011 - 12:15:30

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	456017321	13/07/2011	35.907.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	VR. LUNDITARIO	VR. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-112591- -00000-0000

Fecha: 2011-09-01 16:04:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 196

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 14 de 2011 - 12:15:52

17804

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0033051

Bogotá D.C., Abril 11 de 2011 - 07:12:31

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391765975	08/04/2011	43.684.700.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	540.000.00	540.000.00
				\$540.000.00

SON: **QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-112591- -00000-0000

Fecha: 2011-09-01 16:04:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 196

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 11 de 2011 - 07:12:41

5 117819

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0058848

Bogotá D.C., Junio 17 de 2011 - 16:42:49

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	456015324	17/06/2011	25.888.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	135.000.00	135.000.00
				\$135.000.00

SON: **CIENTO TREINTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-112591- -00000-0000

Fecha: 2011-09-01 16:04:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 196

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Junio 17 de 2011 - 16:42:55

6 11789

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0014426
		Bogotá D.C., Febrero 16 de 2011 - 16:51:23

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391765872	16/02/2011	32.257.100.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	27.000.00 27.000.00
			\$27.000.00
			=====

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-112591- -00000-0000

Fecha: 2011-09-01 16:04:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 196

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Plsos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 16 de 2011 - 16:51:29

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

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 September 2010 (30.09.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/111254 A9

- (51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/028291

(22) International Filing Date:
23 March 2010 (23.03.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/163,241 25 March 2009 (25.03.2009) US

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LIANG, Wei-Ching [CN/US]; 342 Menhaden Court, Foster City, CA 94404
- (US). PLOWMAN, Gregory, D. [US/US]; 1386 Chestnut Street, San Carlos, CA 94070 (US). WU, Yan [US/US]; 1160 Blythe Street, Foster City, CA 94404 (US). YE, Weilan [US/US]; 119 Barkentine Street, Foster City, CA 94404 (US).

(74) Agents: FANG, Carol, A. et al.; Genentech, Inc., 1 DNA Way, MS 49, South San Francisco, CA 94080 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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,

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL ANTI- $\alpha 5 \beta 1$ ANTIBODIES AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention provides new anti- $\alpha 5 \beta 1$ antibodies, compositions and kits comprising the antibodies, and methods of making and using the antibodies.

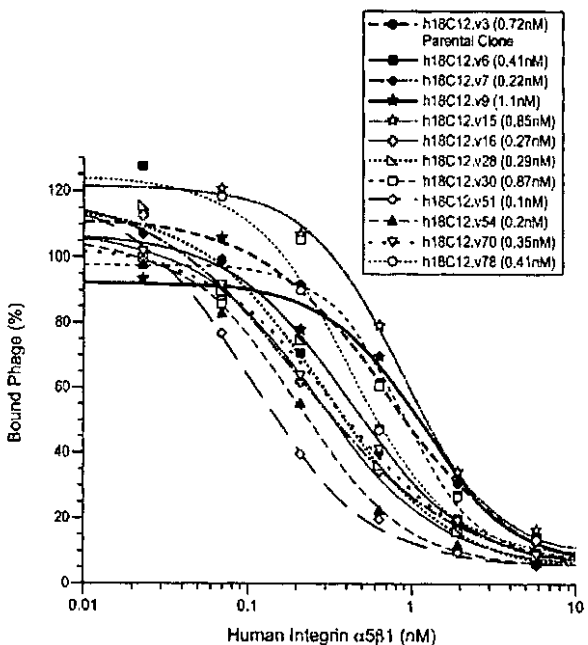


FIG. 4

WO 2010/111254 A9

WO 2010/111254 A9

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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(48) Date of publication of this corrected version: 2 December 2010

(15) Information about Correction: see Notice of 2 December 2010

Published:
— with international search report (Art. 21(3))

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
(PCT)

VERSIÓN CORREGIDA

(19) Organización Mundial de Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
30 de septiembre de 2010 (30.09.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/111254 A9

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

[US/US]; 1386 Chestnut Street, San Carlos, CA 94070 (US). WU, Yan [US/US]; 1160 Blythe Street, Foster City, CA 94404 (US). YE, Weilan [US/US]; 119 Barkentine Street, Foster City, CA 94404 (US).

(21) Numero de Solicitud Internacional:
PCT/US2010/028291

(74) Agente: FANG, Carol, A. et al; Genentech, Inc. 1 DNA Way, MS 49, South San Francisco, CA 94080 (US).

(22) Fecha de Presentación Internacional:
23 de marzo de 2010 (23.03.2010)

(81) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Lenguaje de entrega: Inglés

(26) Lenguaje de Publicación: Inglés

(30) Datos de la Prioridad:
61/163,241 25 de marzo de 2009 (25.03.2009) US

(71) Solicitante (para todos los Estados designados menos los Estados Unidos): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(84) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea ((AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (solo para los Estados Unidos): LIANG, Wei-Ching [CN/US]; 342 Menhaden Court, Foster City, CA 94404 (US). PLOWMAN, Gregory, D.

(54) Título: NUEVOS ANTICUERPOS Anti-α5β1 Y SUS USOS

P4170R1
6 / 12

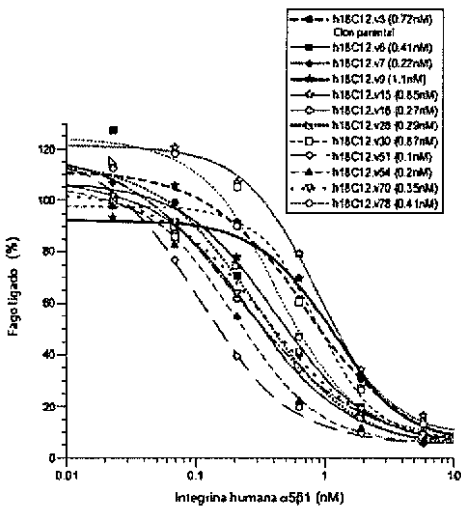


FIG. 4

(57) Resumen: La presente invención provee nuevos anticuerpos anti-α5β1, composiciones y equipos que comprenden los anticuerpos, y métodos para la preparación y el uso de los anticuerpos.

LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- con un listado de secuencias parte de la descripción (Regla 5.2(a))

(48) Fecha de publicación de esta versión corregida:

02 de diciembre de 2010

Publicado:

(15) Información acerca de la corrección:

- con el informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

Ver Notificación del 2 de diciembre de 2010

NUEVOS ANTICUERPOS ANTI- $\alpha 5\beta 1$ Y SUS USOS

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS.

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Nro. 61/ 163241, presentada el 25 de marzo de 2009, cuya revelación se incorpora a modo de referencia en su totalidad, para todos los propósitos.

CAMPO DE LA INVENCION.

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos $\alpha 5\beta 1$, a composiciones y equipos que comprenden los anticuerpos, y a métodos para el uso de los anticuerpos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION.

La $\alpha 5\beta 1$ integrina es una glicoproteína de membrana celular que media las interacciones de célula-ECM (sigla en inglés de "matriz extracelular") a través de su ligando mayor, la fibronectina. La $\alpha 5\beta 1$ integrina cumple un rol en la migración, diferenciación y supervivencia celulares. Las concentraciones de $\alpha 5\beta 1$ integrina son elevadas en el endotelio vascular tumoral (por ejemplo, en carcinomas gástrico, colorrectal, hepatocelular, uterocervical y mamario) y en otros vasos angiogénicos. La $\alpha 5\beta 1$ integrina modula la asociación de células murales con células endoteliales y el montaje de la matriz extracelular endotelial durante la angiogénesis. De esta manera, la $\alpha 5\beta 1$ integrina es un blanco útil para la inhibición de la angiogénesis y la sensibilización de las células a los efectos de un antagonista de VEGF (sigla en inglés de "factor de crecimiento endotelial vascular").

Por lo tanto, existe en el arte una necesidad de composiciones y métodos que se dirijan a la $\alpha 5\beta 1$ integrina. La presente invención cumple con esta y con otras necesidades.

SÍNTESIS DE LA INVENCION.

La presente invención provee nuevos anticuerpos anti- $\alpha_5\beta_1$ derivados del anticuerpo monoclonal 18C12; equipos y composiciones que comprenden los nuevos anticuerpos anti- $\alpha_5\beta_1$; y métodos para su elaboración y uso.

Una realización de la invención provee un anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ que comprende un dominio VL que comprende una CDR-L1 (CDR: sigla en inglés de "región de determinación de complementariedad") que comprende TL-S/T-S/P/T-Q/N-H-F/S-T/I-Y-K/T-I-G/D/S (SEC. ID. NRO.: 15); una CDR-L2 que comprende L/I-N/T-S-D/H/S-G/S-S/L/T-H/Y-N/K/Q/I-K/T-G/A-D/S/V (SEC. ID. NRO.: 16); una CDR-L3 que comprende G/A-S/A/Y-S/Y-Y-S/A/Y-S/Y/T-GY-V/I (SEC. ID. NRO.: 17); y un dominio VH que comprende una CDH-H1 que comprende GFTFS-N/A-RW-I/V-Y (SEC. ID. NRO.: 18); una CDR-H2 que comprende GIKTKP-N/A/T-I/R-YAT-E/Q-YADSVKG (SEC. ID. NRO.: 19); y una CDR-H1 que comprende L/V-TG-M/K-R/K-YFDY (SEC. ID. NRO.: 20). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ comprende un dominio VL que comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde cada una comprende una secuencia expuesta en Figura 3 y un dominio VH que comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde cada una comprende una secuencia expuesta en la Figura 3; es decir, un dominio VL que comprende una CDR-L1 que comprende una secuencia expuesta en SEC. ID. NRO.: 21, 22, 23, ó 24, una CDR-L2 que comprende una secuencia expuesta en SEC. ID. NRO.: 25, 26, 27, ó 28, y una CDR-L3 que comprende una secuencia expuesta en SEC. ID. NRO.: 29, 30, 31, ó 32; y un dominio VH que comprende una CDR-H1 que comprende una secuencia expuesta en SEC. ID. NRO.: 34 ó 35, una CDR-H2 que comprende una secuencia expuesta en SEC. ID. NRO.: 36 ó 37, y una CDR-H3 que comprende una secuencia expuesta en SEC. ID. NRO.: 38, 39 ó 40. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ comprende un dominio VL que comprende cualquiera de SEC. ID. NROS.: 3-8 y un dominio VH que comprende cualquiera de SEC. ID. NROS.: 11-14. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ comprende un dominio VL que comprende SEC. ID. NRO.: 4 y un dominio VH que comprende SEC. ID. NRO.: 11. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$

comprende un dominio VL que comprende SEC. ID. NRO.: 5 y un dominio VH que comprende SEC. ID. NRO.: 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ comprende un dominio VL que comprende SEC. ID. NRO.: 6 y un dominio VH que comprende SEC. ID. NRO.: 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ comprende un dominio VL que comprende SEC. ID. NRO.: 7 y un dominio VH que comprende SEC. ID. NRO.: 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ comprende un dominio VL que comprende SEC. ID. NRO.: 8 y un dominio VH que comprende SEC. ID. NRO.: 14. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ es humano, humanizado o quimérico. En una realización, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ compite con el anticuerpo 18C12 por la unión a $\alpha_5\beta_1$ integrina. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ es un fragmento de anticuerpo que se une a $\alpha_5\beta_1$. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ se selecciona de: un fragmento Fab, Fab', un fragmento F(ab)'₂, Fv de cadena simple (scFv), un fragmento Fv; un diacuerpo y un anticuerpo lineal. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ es un IgG1 de longitud completa o un IgG4 de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se une a VEGF y $\alpha_5\beta_1$ y es un antagonista de VEGF. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ tiene una función efectora alterada. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ está alterado de modo de disminuir o evitar la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés) o de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, por sus siglas en inglés) (por ejemplo, alterando la secuencia de ácido nucleico que codifica la porción Fc del anticuerpo). En algunas realizaciones, la porción Fc del anticuerpo comprende una sustitución N297A. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ ha sido modificado de modo de incrementar o disminuir su semivida en humanos (por ejemplo, alterando la secuencia de ácido nucleico que codifica la porción Fc del anticuerpo). En algunas realizaciones, el anticuerpo $\alpha_5\beta_1$ es parte de un inmunoconjugado que está conjugado a otra

entidad (por ejemplo, un agente terapéutico o una marca detectable). En algunas realizaciones, la entidad terapéutica es un agente citotóxico (por ejemplo, un isótopo radiactivo, una toxina, un agente inhibidor del crecimiento, o un agente quimioterapéutico). En algunas realizaciones, la marca detectable es un colorante fluorescente, un radioisótopo, o una enzima.

Otras realizaciones de la invención proveen moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de los anticuerpos anti- $\alpha_5\beta_1$ que se describen en la presente solicitud; vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos, y células huéspedes que comprenden los ácidos nucleicos. Aun otras realizaciones de la invención proveen métodos para la producción de cualquiera de los anticuerpos anti- $\alpha_5\beta_1$ que se describen en esta solicitud, donde los métodos comprenden el cultivo de las células huéspedes de modo de producir el anticuerpo. En algunas realizaciones, los métodos además comprenden la recuperación del anticuerpo de la célula huésped.

Otras realizaciones de la invención proveen composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo para $\alpha_5\beta_1$ de esta invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden además por lo menos uno, dos, tres, cuatro o más agentes adicionales, que incluyen, por ejemplo, un antagonista de VEGF. En algunas realizaciones, los agentes adicionales se seleccionan de un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, o un agente antiangiogénico. En algunas realizaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab. Asimismo, la invención provee artículos de fabricación y equipos que comprenden instrucciones para la detección de $\alpha_5\beta_1$ (por ejemplo, en un sujeto que se ha tratado con un antagonista de VEGF).

Otra realización de la invención provee métodos de tratamiento de sujetos que sufren de una enfermedad o un trastorno que involucra la angiogénesis, permeabilidad vascular o pérdida vascular anormales. Los métodos comprenden la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos anti- $\alpha_5\beta_1$ que se describen en la presente solicitud, a fin de tratar de

este modo la enfermedad o el trastorno (por ejemplo, mediante la inhibición parcial o completa de la angiogénesis, la permeabilidad vascular o la pérdida vascular anormales). En algunas realizaciones, se administra además al sujeto un antagonista de VEGF. En algunas realizaciones, el antagonista de VEGF y el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ se administran en forma conjunta. En algunas realizaciones, el antagonista de VEGF y el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ se administran en forma sucesiva. En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno es sensible a las terapias con antagonista de VEGF. En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno se selecciona de: un tipo de cáncer, una enfermedad inmunitaria o una enfermedad ocular. De acuerdo con una realización, la enfermedad o el trastorno se selecciona de: un tumor sólido, un tumor metastásico, un tumor de tejido blando, una enfermedad que tiene neovascularización ocular, una enfermedad inflamatoria que presenta angiogénesis anormal, una enfermedad que surge como consecuencia del trasplante en el sujeto, y una enfermedad que presenta proliferación anormal de tejido fibrovascular. De acuerdo con otra realización, el cáncer se selecciona de: cáncer de mama (que incluye cáncer de mama metastásico), cáncer cervical, cáncer colorrectal (que incluye cáncer colorrectal metastásico), cáncer de pulmón (que incluye cáncer de pulmón de células no pequeñas), linfoma no hodgkiniano (NHL, por sus siglas en inglés), leucemia linfocítica crónica, cáncer de célula renal, cáncer de próstata que incluye cáncer de próstata con resistencia hormonal, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, mesotelioma, cáncer de tejido blanco, tumor estromal gastrointestinal, glioblastoma multiforme y mieloma múltiple. De acuerdo con otra realización, la enfermedad se selecciona de: retinopatía, degeneración macular relacionada con la edad (por ejemplo, ADM (sigla en inglés de "degeneración macular de la edad") húmeda), edema macular diabético, oclusión venosa retiniana (RVO, por sus siglas en inglés) y AMD seca/atrofia geográfica (para la prevención del avance a AMD húmeda) rubeosis; soriasis, una enfermedad renal inflamatoria, síndrome urémico hemolítico, nefropatía diabética (por ejemplo, retinopatía diabética proliferativa), artritis (por ejemplo, artritis soriásica, artrosis, artritis reumatoide), enfermedad intestinal inflamatoria,

inflamación crónica, desprendimiento de retina crónico, uveítis crónica, vitritis crónica, rechazo de injerto corneal, neovascularización corneal, neovascularización de injerto corneal, enfermedad de Crohn, miopía, enfermedad neovascular ocular, enfermedad de Paget, penfigoide, poliarteritis, queratotomía radial posláser, neovascularización retiniana, síndrome de Sogren, colitis ulcerosa, rechazo de injerto, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, edema, ascitis asociadas con enfermedades malignas, accidente cerebrovascular, angiofibroma y glaucoma neovascular. En una realización, los métodos además comprenden la administración de un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente antineoplásico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, o un agente citotóxico) al sujeto.

Aun otra realización de la invención provee métodos de tratamiento de cáncer en un sujeto, donde los métodos comprenden: la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de VEGF y un anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$. En algunas realizaciones, el antagonista de VEGF y el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ se administran en forma conjunta. En algunas realizaciones, el antagonista de VEGF y el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ se administran en forma sucesiva. En algunas realizaciones, el cáncer es sensible a las terapias con antagonista de VEGF.

Una realización adicional de la invención provee métodos de tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (que incluye, por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad húmeda) en un sujeto que sufre de AMD, donde los métodos comprenden: la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de VEGF y un anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$. En algunas realizaciones, el antagonista de VEGF y el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ se administran en forma conjunta. En algunas realizaciones, el antagonista de VEGF y el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ se administran en forma sucesiva. En aun otra realización, se provee un método de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de VEGF y un antagonista de $\alpha_5\beta_1$, en forma conjunta o sucesiva.

En algunas realizaciones, el antagonista de VEGF se administra inicialmente al sujeto por tratar, y subsiguientemente, se administra al sujeto el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$. En algunas realizaciones, el antagonista de VEGF y el antagonista de $\alpha_5\beta_1$ se administran al sujeto en forma simultánea. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ se administra inicialmente al sujeto por tratar, y subsiguientemente, se administra al sujeto el antagonista de VEGF. En algunas realizaciones, el sujeto es tratado con el antagonista de VEGF hasta que el sujeto ya no responde al tratamiento con antagonista de VEGF, y luego, se trata el sujeto con el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$. En una realización particular, el sujeto se trata con el antagonista de VEGF cuando el cáncer no es invasivo, o cuando se presenta en una etapa temprana, y se trata con el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ cuando el cáncer es invasivo. En otra realización, el sujeto tratado con el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ tiene elevadas concentraciones de $\alpha_5\beta_1$ en un tejido enfermo, en comparación con tejido de un sujeto que no sufre de la enfermedad, o en comparación con tejido no enfermo. En este caso, el método además puede incluir la etapa de detección de $\alpha_5\beta_1$ en el sujeto, por ejemplo, en un tejido enfermo luego del tratamiento con un antagonista de VEGF. De acuerdo con una realización, el cáncer invasivo es un cáncer con metástasis. De acuerdo con otra realización, el cáncer en etapa temprana es un tipo de cáncer tratado con terapia complementaria (por ejemplo, quimioterapia o remoción quirúrgica).

De acuerdo con una realización de esta invención, el sujeto por ser tratado con un anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ sufre una recaída luego del tratamiento con antagonista de VEGF, o se ha tornado resistente al tratamiento con antagonista de VEGF. De acuerdo con otra realización, el sujeto por ser tratado con un anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ y un antagonista de VEGF sufre de un tipo de cáncer metastásico, o ha sido tratado previamente con terapia complementaria. En una realización, el paciente candidato ha sufrido una recaída, o es resistente a un agente quimioterapéutico tal como irinotecano. Ejemplos de dichas enfermedades incluyen, sin limitación, cáncer colorrectal metastásico, cáncer colorrectal metastásico de recaída, cáncer de mama metastásico, cáncer de mama metastásico de recaída, cáncer de mama metastásico HER2⁺, cáncer de mama

tratado con tratamiento complementario, cáncer de mama HER2⁺ tratado con tratamiento complementario, cáncer pancreático metastásico, cáncer de colon tratado con tratamiento complementario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer rectal tratado con tratamiento complementario, cáncer de pulmón de células no pequeñas tratado con tratamiento complementario, cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico, cáncer de ovario metastásico, cáncer de célula renal metastásico, y cáncer de célula renal tratado con tratamiento complementario.

De conformidad con una realización, se administra al sujeto que sufre de una enfermedad descrita en esta solicitud un tratamiento de mantenimiento luego del tratamiento para la enfermedad con un antagonista de VEGF, donde el tratamiento de mantenimiento consiste en un antagonista de $\alpha_5\beta_1$ solo, o en forma sucesiva o conjunta con un antagonista de VEGF.

En algunas realizaciones, el antagonista de VEGF se selecciona de: un anticuerpo, una inmunoadhesina, un peptidocuerpo, una molécula pequeña y un ácido nucleico que hibrida a una molécula de ácido nucleico que codifica VEGF en condiciones rigurosas (por ejemplo, ribozima, ARNsi y aptámero). En algunas realizaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal). De acuerdo con una realización, el anticuerpo anti-VEGF es capaz de ser inhibido en forma competitiva para la unión a VEGF humano por el anticuerpo Avastin®. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo anti-VEGF es humano, humanizado o quimérico. De acuerdo con una realización específica, el anticuerpo anti-VEGF es el anticuerpo Avastin®. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo anti-VEGF se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, Fab', un fragmento F(ab')₂, Fv de cadena simple (scFv), un fragmento Fv; un diacuerpo y un anticuerpo lineal. De acuerdo con otra realización, el antagonista de VEGF es un anticuerpo biespecífico que se une tanto a VEGF como a $\alpha_5\beta_1$ y es además un antagonista de $\alpha_5\beta_1$.

Una realización adicional de la invención provee métodos de detección de proteína $\alpha_5\beta_1$ en una muestra que se sospecha contiene la proteína $\alpha_5\beta_1$. Los métodos comprenden: (1) el contacto de los anticuerpos que se describen en la

presente solicitud, con la muestra; y la detección de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ y la proteína $\alpha_5\beta_1$. En algunas realizaciones, la muestra es de un paciente diagnosticado con una enfermedad caracterizada por la angiogénesis anormal, la permeabilidad vascular anormal, o la pérdida vascular.

Estas y otras realizaciones de la invención se describen adicionalmente en la descripción detallada que sigue.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

La Figura 1 representa la alineación de secuencias de los dominios variables de cadena liviana para los siguientes: lambda III humano; 18C12 de hámster; 18C12.v.1.1 quimérico; h18C12.v3; h18C12.v6; h18C12.v6.1.Lam3; h18C12.v6.2Lam3; y h18C12.v6.1.5.

La Figura 2 representa alineaciones de secuencias del dominio variable de cadena pesada para los siguientes: 18C12 de hámster; h18C12.v3; h18C12.v6; h18C12.v6.1.Lam3; h18C12.v6.2Lam3; y h18C12.v6.1.5.

La Figura 3 representa secuencias CDR de las variantes maduras para afinidad de h18C12.v3 y h18C12.v3: h18C12.v6; h18C12.v7; h18C12.v9; h18C12.v15; h18C12.v16; h18C12.v28; h18C12.v30; h18C12.v51; h18C12.v54; h18C12.v70; y h18C12.v78.

La Figura 4 representa los resultados de un ensayo ELISA de competición de fagos que demuestra la unión del clon parental h18C12.v3 y las variantes maduras para afinidad de 18C12 h18C12.v6; h18C12.v7; h18C12.v9; h18C12.v15; h18C12.v16; h18C12.v28; h18C12.v30; h18C12.v51; h18C12.v54; h18C12.v70; y h18C12.v78, a $\alpha_5\beta_1$ integrina humana.

La Figura 5 representa los resultados de un análisis BIACORE® de unión del clon parental h18C12.v3 y las variantes maduras para afinidad de h18C12.v3 h18C12.v6; h18C12.v15; h18C12.v54; y h18C12.v70 a $\alpha_5\beta_1$ integrina humana.

La Figura 6 representa los resultados de un análisis BIACORE® de unión de 18C12 quimérico y h18C12.v6.1.Lam3 a $\alpha_5\beta_1$ integrina humana.

La Figura 7 representa los resultados de un análisis BIACORE® de unión de h18C12.v6.1 clones h18C12.v6.1.1, h18C12.v6.1.2, h18C12.v6.1.3, h18C12.v6.1.4, y h18C12.v6.1.5, y expone la secuencia CDR-L2 en las posiciones 50a, 50b, 50c y 50d para cada uno de los clones h18C12.v6.1.

La Figura 8 representa los resultados de un ensayo de unión de fibronectina que compara la capacidad de 18C12 quimérico y h18C12.v6.1 para interferir con la unión de células U937 a fibronectina.

La Figura 9 representa los resultados de un ensayo de unión de fibronectina que compara la capacidad de 18C12 de hámster y h18C12.v6.1.5 para interferir con la unión de células U937 a fibronectina.

La Figura 10 representa los resultados de un ensayo de unión de fibronectina que compara la capacidad de 18C12 de hámster y h18C12.v6.1.5 para interferir con la unión de $\alpha_5\beta_1$ a fibronectina.

La Figura 11 representa los resultados de un ensayo de migración HUVEC que compara la capacidad de 18C12 quimérico y h18C12.v6.1 para interferir con la migración de células HUVEC a fibronectina.

La Figura 12 representa los resultados de un ensayo de xenoinjerto de tumor que mide la capacidad de h18C12.v6.1.5 +/- anti-VEGF para aumentar la supervivencia.

La Figura 13 representa los resultados de un ensayo de xenoinjerto de tumor que mide la capacidad de h18C12.v6.1.5 +/- anti-VEGF para reducir la carga tumoral.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.

I. Introducción.

La presente invención se basa en la identificación de nuevos anticuerpos que se unen a $\alpha_5\beta_1$ integrina. Los anticuerpos para $\alpha_5\beta_1$ derivan del anticuerpo monoclonal 18C12, y pueden usarse en una diversidad de métodos terapéuticos y de diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos para $\alpha_5\beta_1$ pueden utilizarse solos o en combinación con otros agentes para el tratamiento de la angiogénesis anormal, neoplasia, de enfermedades oculares y enfermedades autoinmunitarias. Los

anticuerpos además pueden emplearse para la detección de proteína $\alpha_5\beta_1$ en pacientes o en muestras de pacientes, mediante la administración de los anticuerpos para la proteína $\alpha_5\beta_1$ a los pacientes, y la detección de anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ ligado a la proteína $\alpha_5\beta_1$ en una muestra del paciente (por ejemplo, *in vivo* o *ex vivo*), o mediante el contacto de los anticuerpos con muestras de los pacientes y la detección cualitativa o cuantitativa del anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ ligado a la proteína $\alpha_5\beta_1$.

II. Definiciones.

"Alfa5beta1", o " $\alpha_5\beta_1$ ", "a5b1", o " $\alpha_5\beta_1$ ", es una integrina que comprende dos proteínas diferentes (es decir, subunidades Alfa5 y beta1). La $\alpha_5\beta_1$ ha demostrado unirse a fibronectina, L1-CAM y fibrinógeno. La $\alpha_5\beta_1$ integrina también se conoce como Activación-5 muy tardía, VLA-5, alfa5beta1, CD49e/CD29, receptor de fibronectina, FNR y GPIc-IIa. De acuerdo con una realización, la proteína $\alpha_5\beta_1$ es una proteína $\alpha_5\beta_1$ humana.

"Alfa5" se usa en esta solicitud de modo indistinto con CD49e, α_5 , integrina subunidad alfa5, subunidad alfa VLA-5, subunidad IC de GPIc-IIa, y FNR cadena alfa se refiere a una subunidad de la $\alpha_5\beta_1$ integrina. Alfa5 tiene cuatro isoformas generadas por el empalme alternativo (A-D), y que varían dentro de sus dominios citoplásmicos. Las secuencias de aminoácidos para las isoformas humanas de alfa5 pueden hallarse, por ejemplo, en los Números de Acceso de Genbank: X07979, U33879, U33882 y U33880, respectivamente.

"Beta1" es también denominada CD29, beta1, GPIIa plaquetaria; VLA-cadena beta; cadena de integrina beta-1, CD29; FNRB; MDF2; VLAB; GPIIA; MSK12 y VLA5B. Las secuencias de aminoácidos para Beta1 humana pueden hallarse, por ejemplo, en el Nro. de Acceso Genbank X06256.

El término "VEGF", de acuerdo con la presente solicitud, se refiere al factor de crecimiento celular endotelial vascular humano de 165 aminoácidos y factores de crecimiento celular endotelial vascular humanos relacionados de 121, 189 y 206 aminoácidos, como lo describen Leung *et al.*, *Science*, 246: 1306 (1989), y Houck *et al.*, *Mol. Endocrin.*, 5: 1806 (1991), junto con sus formas naturales

alélicas y procesadas. El término "VEGF" además se refiere a VEGF de especies no humanas, tales como ratón, rata o primate. A veces, el VEGF de una especie determinada se indica con términos tales como hVEGF, para VEGF humano, mVEGF, para VEGF murino, etc. El término "VEGF" se usa también para hacer referencia a formas truncadas del polipéptido que comprenden los aminoácidos 8 a 109, ó 1 a 109, del factor de crecimiento celular endotelial vascular humano de 165 aminoácidos. La referencia a cualquiera de dichas formas de VEGF puede ser identificada en la presente solicitud, por ejemplo, por medio de "VEGF (8–109)", "VEGF (1–109)" o "VEGF₁₆₅". Las posiciones de aminoácidos para un VEGF nativo "truncado" se enumeran según lo indicado en la secuencia de VEGF nativa. Por ejemplo, la posición de aminoácido 17 (metionina) en VEGF nativo truncado también es 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. De acuerdo con una realización, el VEGF es un VEGF humano.

Un "antagonista de VEGF" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular o reducir las actividades de VEGF, o de interferir con las actividades de VEGF, que incluye su unión a VEGF o a uno o más receptores de VEGF, o al ácido nucleico que los codifican. Preferentemente, el antagonista de VEGF se une a VEGF o a un receptor de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen anticuerpos anti-VEGF y sus fragmentos de unión de antígeno, polipéptidos que se unen a VEGF y receptores de VEGF y bloquean la interacción de ligando-receptor (por ejemplo, inmunoadhesinas, peptidocuerpos), anticuerpos antirreceptor VEGF y antagonistas del receptor VEGF tales como inhibidores de molécula pequeña de las tirosina quinasas de VEGFR (sigla en inglés de "receptor de factor de crecimiento endotelial vascular"), aptámeros que se unen a VEGF y ácidos nucleicos que hibridan en condiciones rigurosas a secuencias de ácido nucleico que codifican VEGF o receptor VEGF (por ejemplo, ARNi). De acuerdo con una realización, el antagonista de VEGF se une a VEGF e inhibe la proliferación celular endotelial inducida por VEGF *in vitro*. De acuerdo con una realización, el antagonista de VEGF se une a VEGF o a un receptor de VEGF con mayor afinidad que un no VEGF o un receptor no VEGF. De acuerdo con una

realización, el antagonista de VEGF se une a VEGF o a un receptor de VEGF con un valor K_d de entre 1 μM y 1 pM. De acuerdo con otra realización, el antagonista de VEGF se une a VEGF o a un receptor de VEGF con un valor entre 500 nM y 1 pM.

Conforme a una realización, el antagonista de VEGF se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido tal como un anticuerpo, un peptidocuerpo, una inmunoadhesina, una molécula pequeña o un aptámero. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-VEGF tal como el anticuerpo AVASTIN[®], o un anticuerpo antirreceptor VEGF tal como un anti-VEGFR2 o un anticuerpo anti-VEGFR3. Otros ejemplos de antagonistas de VEGF incluyen: VEGF-Trap, Mucagen, PTK787, SU11248, AG-013736, Bay 439006 (sorafenib), ZD-6474, CP632, CP-547632, AZD-2171, CDP-171, SU-14813, CHIR-258, AEE-788, SB786034, BAY579352, CDP-791, EG-3306, GW-786034, RWJ-417975/CT6758 y KRN-633.

Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une a VEGF con suficiente afinidad y especificidad. Preferentemente, el anticuerpo anti-VEGF de la invención puede usarse como un agente terapéutico para dirigirse a enfermedades o afecciones donde participa la actividad de VEGF, e interferir con ellas. Un anticuerpo anti-VEGF habitualmente no se unirá a otros homólogos de VEGF, tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como PlGF, PDGF o bFGF. Un anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709. Más preferentemente, el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF recombinado humanizado generado de acuerdo con Presta *et al.* (1997): *Cancer Res.*, 57: 4593-4599, que incluye, sin limitación, el anticuerpo conocido como bevacizumab (BV; Avastin[®]). De acuerdo con otra realización, los anticuerpos anti-VEGF que pueden usarse incluyen, sin limitación, los anticuerpos revelados en el documento WO 2005/012359. De acuerdo con una realización, el anticuerpo anti-VEGF comprende la región pesada variable y la región liviana variable de cualquiera de los anticuerpos revelados en las Figuras 24, 25, 26, 27 y 29 del documento WO

2005/012359 (por ejemplo, G6, G6-23, G6-31, G6-23.1, G6-23.2, B20, B20-4 y B20.4.1). En otra realización, el anticuerpo anti-VEGF conocido como ranibizumab es el antagonista de VEGF administrado para la enfermedad ocular, tal como retinopatía diabética y AMD húmeda.

El anticuerpo anti-VEGF "bevacizumab (BV)", también conocido como "rhuMAb VEGF" o "Avastin®", es un anticuerpo monoclonal recombinado humanizado anti-VEGF generado de acuerdo con Presta *et al.* (1997): *Cancer Res.*, 57: 4593-4599. Este anticuerpo comprende regiones de marco IgG1 humanas mutadas y regiones de determinación de complementariedad de unión de antígeno del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF murino A.4.6.1, que bloquea la unión de VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente 93% de la secuencia de aminoácidos de bevacizumab, que incluye la mayoría de las regiones de marco, deriva de IgG1 humano, y aproximadamente 7% de la secuencia deriva del anticuerpo murino A4.6.1. Bevacizumab tiene una masa molecular de alrededor de 149.000 daltones, y es glicosilado. Otros anticuerpos anti-VEGF incluyen los anticuerpos descritos en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.884.879 y en el documento WO 2005/044853.

El anticuerpo anti-VEGF ranibizumab, o el anticuerpo LUCENTIS® o rhuFab V2 es un fragmento Fab de VEGF antihumano, madurado para afinidad, humanizado. Ranibizumab es producido por medio de métodos de biotecnología convencionales en vector de expresión de *E. coli* y fermentación bacteriana. Ranibizumab no es glicosilado, y tiene una masa molecular de ~48.000 daltones. Ver los documentos WO 98/45331 y U. S. 2003/0190317.

Las moléculas, tales como anticuerpos, que se caracterizan por la unión a áreas superpuestas o similares en un blanco, pueden identificarse por medio de ensayos competitivos de inhibición y unión.

En una realización, se usan células HUVEC u otras células que expresan $\alpha_5\beta_1$, en un ensayo de inhibición competitivo, y se utiliza FACS a fin de evaluar las ubicaciones de unión de dos anticuerpos anti- $\alpha_5\beta_1$ en relación entre sí. Por ejemplo, las células HUVEC pueden lavarse en un tubo cónico y centrifugarse 5 min @ 1000 r. p. m. La miniesfera típicamente se lava dos veces. A continuación,

las células pueden ser resuspendidas, contadas, y mantenidas en hielo hasta el uso. Pueden agregarse al receptáculo 100 μ l de un primer anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ (por ejemplo, iniciando en una concentración de 1 μ g/ml o concentración menor). A continuación, pueden agregarse 100 μ l de células (por ejemplo, 20×10^5 células) por receptáculo, e incubarse en hielo durante 30 min. Luego, pueden agregarse 100 μ l de un anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ biotinilado (5 μ g/ml de carga) a cada receptáculo, e incubarse en hielo durante 30 min. Luego se lavan las células y se miniesferizan durante 5 min @ 1000 r. p. m. Se aspira el sobrenadante. Se agrega al receptáculo estreptavidina R-ficoeritrina conjugada (Jackson 016-110-084) (100 μ l @ 1:1000). A continuación, la placa puede envolverse en lámina de aluminio e incubarse en hielo durante 30 min. Luego de la incubación, la miniesfera puede lavarse y miniesferizarse 5 min @ 1000 r. p. m. La miniesfera puede resuspenderse y transferirse a tubos de microvaloración para el análisis FACS.

Un "agente o factor angiogénico" es un factor de crecimiento o su receptor que participa en la estimulación del desarrollo de vasos sanguíneos, por ejemplo, favorece la angiogénesis, el crecimiento celular endotelial, la estabilidad de vasos sanguíneos y la vasculogénesis, etc. Por ejemplo, los factores angiogénicos incluyen, sin limitación, VEGF y miembros de la familia VEGF y sus receptores (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3), PIGF, la familia PDGF, la familia de factor de crecimiento de fibroblasto (FGF, por sus siglas en inglés), ligandos TIE (sigla en inglés de "tirosina quinasa con dominios de tipo inmunoglobulina y de tipo EGF (factor de crecimiento epidérmico)") (Angiopoyetinas, ANGPT1, ANGPT2), TIE1, TIE2, efrinas, Bv8, ligando 4 de tipo Delta (DLL4), Del-1, factores de crecimiento de fibroblasto: ácidos (aFGF) y básicos (bFGF), FGF4, FGF9, BMP9, BMP10; folistatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés), GM-CSF (sigla en inglés de "factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos"), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés)/ factor de diseminación (SF, por sus siglas en inglés), interleuquina-8 (IL-8), CXCL12, leptina, midquina, neuropilinas, NRP1, NRP2, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento

celular endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento derivado de plaquetas, en especial, PDGF-BB, PDGFR-alfa o PDGFR-beta, pleiotrofina (PTN), progranulina, proliferina, factor alfa de crecimiento de transformación (TGF-alfa, por sus siglas en inglés), factor beta de crecimiento de transformación (TGF-beta), factor-alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa, por sus siglas en inglés), Alk1, CXCR4, Notch1, Notch4, Sema3A, Sema3C, Sema3F, Robo4, etc. Además incluyen factores que favorecen la angiogénesis, tales como ESM1 y Perlecan. Asimismo, incluyen factores que aceleran la curación de heridas tales como la hormona de crecimiento, factor-I de crecimiento de tipo insulínico (IGF-I, por sus siglas en inglés), VIGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), dominio de tipo EGF, múltiple 7 (EGFL7), CTGF y miembros de su familia, y TGF-alfa y TGF-beta. Ver, por ejemplo, las referencias de Klagsbrun y D'Amore (1991): *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, la Tabla 1 lista factores angiogénicos conocidos); y Sato (2003), *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206.

Un "agente antiangiogénico" o "inhibidor angiogénico" se refiere a un agente de peso molecular pequeño, un polinucleótido (que incluye, por ejemplo, un ARN inhibidor (ARNi o ARNsi)), un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinada, un anticuerpo, o sus conjugados o proteínas de fusión, que inhibe la angiogénesis, vasculogénesis, o la permeabilidad vascular indeseables, ya sea en forma directa, ya sea en forma indirecta. Debe entenderse que el agente antiangiogénico incluye aquellos agentes que se unen a la actividad angiogénica del factor angiogénico o su receptor, y la bloquean. Por ejemplo, un agente antiangiogénico es un anticuerpo u otro antagonista para un agente angiogénico, como se define con anterioridad, por ejemplo, anticuerpos para VEGF-A o para el receptor de VEGF-A (por ejemplo, el receptor KDR o el receptor Flt-1), inhibidores anti-PDGFR (sigla en inglés de "receptor de factor de crecimiento derivado de plaqueta"), moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor de VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU11248 (sunitinib malato), AMG706, o aquellos descritos, por ejemplo, en la Solicitud de

Patente Internacional WO 2004/113304). Los agentes antiangiogénicos incluyen, sin limitación, los siguientes agentes: inhibidores de VEGF tales como un antagonista específico de VEGF, inhibidor de EGF, inhibidores de EGFR (sigla en inglés de "receptor de factor de crecimiento epidérmico"), Erbitux® (cetuximab, ImClone Systems, Inc., Branchburg, N.J.), Vectibix® (panitumumab, Amgen, Thousand Oaks, CA), inhibidores de TIE2, inhibidores de IGF1R, inhibidores de COX-II (ciclooxigenasa II), inhibidores de MMP-2 (metaloproteinasa de matriz 2) y MMP-9 (metaloproteinasa de matriz 9), CP-547,632 (Pfizer Inc., NY, USA), Axitinib (Pfizer Inc.; AG-013736), ZD-6474 (AstraZeneca), AEE788 (Novartis), AZD-2171, VEGF Trap (Regeneron/Aventis), Vatalanib (también conocido como PTK-787, ZK-222584: Novartis & Schering A G), Macugen (pegaptanib octasódico, NX-1838, EYE-001, Pfizer Inc./Gilead/Eyetech), IM862 (Cytran Inc. of Kirkland, Wash., USA); y angiozima, una ribozima sintética de Ribozyme (Boulder, Colo.) y Chiron (Emeryville, Calif.), y sus combinaciones. Otros inhibidores de la angiogénesis abarcan trombospondina 1, trombospondina 2, colágeno IV y colágeno XVIII. Los inhibidores de VEGF se revelan en las Patentes de los Estados Unidos Nros. 6.534.524 y 6.235.764, ambas, incorporadas en su totalidad para todos los propósitos. Los agentes antiangiogénicos además incluyen inhibidores de la angiogénesis nativos, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Ver, por ejemplo, las referencias de Klagsbrun and D'Amore (1991), *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 217-39; Streit and Detmar (2003), *Oncogene* 22: 3172-3179 (por ejemplo, la Tabla 3, que lista la terapia antiangiogénica 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, que lista factores antiangiogénicos conocidos); y Sato (2003), *Int. J. Clin. Oncol.* 8: 200-206 (por ejemplo, la Tabla 1, que lista agentes antiangiogénicos utilizados en ensayos clínicos).

El término "terapia antiangiogénica" se refiere a una terapia útil para la inhibición de la angiogénesis, que comprende la administración de un agente antiangiogénico.

El “Kd” o “valor Kd” para un anticuerpo anti-VEGF de acuerdo con esta invención, en una realización, se mide por medio de un ensayo de unión de VEGF radiomarcado (RIA, por sus siglas en inglés) efectuado con la versión Fab del anticuerpo y una molécula VEGF, como se describe por medio del siguiente ensayo que mide la afinidad de unión de solución de Fab para VEGF, o mediante el equilibrio de Fab con una concentración mínima de molécula VEGF(109) marcada con (^{125}I) en presencia de una serie de valoración de VEGF no marcado, luego la captura de VEGF ligado con una placa revestida con anticuerpo anti-Fab (Chen, *et al.* (1999), *J. Mol. Biol.*, 293: 865–881). A fin de establecer las condiciones para el ensayo, se revisten placas de microvaloración (Dynex) durante la noche con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio, 50 mM (pH 9,6), y posteriormente, se bloquean con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas, a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), se mezclan 100 pM o 26 pM de [^{125}I]VEGF(109) con diluciones seriales de un Fab de interés (por ejemplo, Fab-12, en la referencia de Presta *et al.* (1997): *Cancer Res.*, 57: 4593–4599). El Fab de interés luego se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período de 65 horas, a fin de garantizar el logro de equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente durante una hora. Luego se remueve la solución, y la placa se lava ocho veces con Tween-20 al 0,1% en PBS. Una vez secadas las placas, se agregan 150 μl /receptáculo de centellante (MicroScint-20; Packard), y las placas se someten a recuento en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos del 20%, o igual al 20%, de unión máxima se seleccionan para el uso en ensayos de unión competitiva. De acuerdo con otra realización, se mide el Kd o valor Kd usando ensayos de resonancia de plasmón de superficie, empleando un instrumento BIACORETM-2000, o un instrumento BIACORETM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ), a 25°C, con chips CM5 de molécula blanco inmovilizada hVEGF(8–109) a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5,

BIAcore Inc., con N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida clorhidrato (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye VEGF humano con acetato de sodio, 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml, antes de la inyección con un caudal de 5 µl/minuto, a fin de lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Luego de la inyección de VEGF humano, se inyecta etanolamina, 1 M, de manera de bloquear los grupos no reaccionados. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones dobles sucesivas de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05% de Tween-20 (PBST (sigla en inglés de "solución salina regulada con fosfato con Tween 20")) a 25°C, con un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan los índices de asociación (k_{on}) y los índices de disociación (k_{off}) usando un simple modelo de unión Langmuir de uno a uno (BIAcore® Evaluation Software version 3.2), mediante la adaptación simultánea de los sensogramas de asociación y de disociación. Se calcula la constante de disociación de equilibrio (K_d) como la relación K_{off}/k_{on} . Ver, por ejemplo, la referencia de Chen, Y. *et al.* (1999): *J. Mol. Biol.*, 293: 865–881. Si el índice de asociación excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón de superficie anterior, entonces puede determinarse el índice de asociación usando una técnica de apagado fluorescente que mide el incremento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm; pase de banda de 16 nm) a 25°C, de un anticuerpo anti-VEGF, 20 nM (forma Fab), en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de la forma corta de VEGF humano (8–109) o VEGF de ratón, medido en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de detención (Aviv Instruments), o un espectrofotómetro 8000-series SLM-AMINCO (ThermoSpectronic) con una probeta agitada. Pueden efectuarse ensayos de unión similares para la determinación del K_d de un anticuerpo o Fab anti- $\alpha 5\beta 1$ usando $\alpha 5\beta 1$ como el blanco.

De acuerdo con la presente solicitud, un sujeto por ser tratado es un mamífero (por ejemplo, humano, primate no humano, rata, ratón, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato, etc.). El sujeto puede ser un paciente clínico, un voluntario de ensayo clínico, un animal experimental, etc. Puede sospecharse que

el sujeto tiene cáncer, una enfermedad inmunitaria, o cualquier otra enfermedad que presente angiogénesis anormal, o puede sospecharse que el paciente presente riesgo de dichas enfermedades; o el paciente puede haber sido diagnosticado con cáncer, una enfermedad inmunitaria o cualquier otra enfermedad que tenga angiogénesis anormal. Muchos métodos de diagnóstico de cáncer, enfermedad inmunitaria o cualquier otra enfermedad que presente angiogénesis anormal, y la delineación clínica de dichas enfermedades, se conocen en el arte. De acuerdo con una realización, el sujeto por ser tratado de acuerdo con esta invención es un humano.

La "angiogénesis anormal" se produce cuando crecen nuevos vasos sanguíneos en forma excesiva o de otro modo inapropiado (por ejemplo, la ubicación, el tiempo, el grado o el inicio de la angiogénesis son indeseados desde el punto de vista médico) en una enfermedad, o de modo tal que se produce una enfermedad. En algunos casos, la angiogénesis excesiva, descontrolada o de otro modo inapropiada se produce cuando hay crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que contribuye al empeoramiento de la enfermedad, o causa una enfermedad, tal como en el caso del cáncer, especialmente, tumores sólidos vascularizados y tumores metastásicos (que incluyen cáncer de colon, cáncer de pulmón (en especial, cáncer de pulmón de células pequeñas) o cáncer de próstata); enfermedades causadas por la neovascularización ocular, especialmente, ceguera diabética, retinopatías, retinopatía diabética primaria, o degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización coroidal (CNV, por sus siglas en inglés), edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel–Lindau, histoplasmosis del ojo, oclusión venosa retiniana central (CRVO, por sus siglas en inglés), neovascularización corneal, neovascularización retiniana y rubeosis; soriasis, artritis soriásica, hemangioblastoma tal como hemangioma; enfermedades renales inflamatorias, tales como glomerulonefritis, en especial, glomerulonefritis mesangioproliferativa, síndrome urémico hemolítico, nefropatía diabética o nefroesclerosis hipertensiva; diversas enfermedades inflamatorias, tales como artritis, en especial, artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, soriasis, sarcoidosis, arterioesclerosis arterial y

enfermedades que se producen luego de trasplantes; endometriosis o asma crónica, y más de setenta afecciones adicionales. Los nuevos vasos sanguíneos pueden alimentar los tejidos enfermos, destruir tejidos normales y, en el caso del cáncer, los nuevos vasos pueden permitir el escape de las células tumorales hacia el torrente sanguíneo, y su alojamiento en otros órganos (metástasis tumorales). La presente invención contempla el tratamiento de aquellos pacientes que presentan riesgo de manifestar las enfermedades mencionadas anteriormente.

La "permeabilidad vascular anormal" se produce cuando el flujo de líquidos, moléculas (por ejemplo, iones y nutrientes) y células (por ejemplo, linfocitos) entre los compartimientos vasculares y extravasculares es excesivo o de otro modo inapropiado (por ejemplo, la ubicación, el tiempo, grado o inicio de la permeabilidad vascular son indeseados desde el punto de vista médico) en una enfermedad, o causa una enfermedad. La permeabilidad vascular anormal puede conducir a la excesiva o de otro modo inapropiada "pérdida" de iones, agua, nutrientes o células a través de la vasculatura. En algunos casos, la excesiva, descontrolada o de otro modo inapropiada permeabilidad vascular o pérdida vascular exacerba o induce enfermedades que incluyen, por ejemplo, edema asociado con tumores, por ejemplo, tumores cerebrales; ascitis asociada con enfermedades malignas; síndrome de Meigs; inflamación pulmonar; síndrome nefrótico; derrame pericárdico; derrame pleural; permeabilidad asociada con enfermedades cardiovasculares, por ejemplo, la afección como consecuencia de infarto de miocardio y accidente cerebrovascular, y similares. La presente invención contempla el tratamiento de aquellos pacientes que han manifestado las enfermedades y los trastornos asociados con la pérdida o permeabilidad vascular anormal, o que presentan riesgo de manifestar dichas enfermedades y trastornos.

Otros pacientes que son candidatos para recibir los anticuerpos o polipéptidos de esta invención manifiestan o se encuentran en riesgo de manifestar la proliferación anormal de tejido fibrovascular, acné rosácea, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, oclusión arterial, queratitis atópica, úlceras bacterianas, enfermedad de Bechet, tumores portados por la sangre, enfermedad obstructiva de la carótida, neovascularización coroidal, inflamación crónica,

desprendimiento de retina crónico, uveítis crónica, vitritis crónica, uso excesivo de lentes de contacto, rechazo de injerto corneal, neovascularización corneal, neovascularización de injerto corneal, enfermedad de Crohn, enfermedad de Eales, queratoconjuntivitis epidémica, úlceras fúngicas, infecciones de herpes simple, infecciones de herpes zoster, síndromes de hiperviscosidad, sarcoma de Kaposi, leucemia, degeneración lípida, enfermedad de Lyme, queratólisis marginal, úlcera de Mooren, infecciones micobacterianas diferentes de lepra, miopía, enfermedad neovascular ocular, fosas ópticas, síndrome de Osler–Weber (Osler–Weber–Rendu), artrosis, enfermedad de Paget, pars planitis, penfigoide, filectenulosis, poliarteritis, complicaciones posláser, infecciones protozoarias, pseudoxantoma elástico, queratoconjuntivitis seca por pterigion, queratotomía radial, neovascularización retiniana, retinopatía de prematuro, fibroplasias retrolentales, sarcoide, escleritis, anemia de célula falciforme, síndrome de Sjögren, tumores sólidos, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Steven's Johnson, queratitis límbica superior, sífilis, lupus sistémico, degeneración marginal de Terrien, toxoplasmosis, traumatismo, tumores de sarcoma de Ewing, tumores de neuroblastoma, tumores de osteosarcoma, tumores de retinoblastoma, tumores de rhabdomioma, colitis ulcerosa, oclusión venosa, deficiencia de vitamina A y sarcoidosis de Wegeners; angiogénesis indeseadas asociadas con diabetes, enfermedades parasitarias, curación anormal de heridas, hipertrofia luego de la cirugía, lesión o traumatismo, inhibición del crecimiento de cabello, inhibición de la ovulación y formación del cuerpo lúteo, inhibición de la implantación e inhibición del desarrollo embrionario en el útero.

Las terapias antiangiogénicas son útiles en el tratamiento general de rechazo de injertos, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, preeclampsia, derrame pericárdico, tal como aquel asociado con pericarditis, y derrame pleural, enfermedades y trastornos caracterizados por la pérdida o permeabilidad vascular indeseable, por ejemplo, edema asociado con tumores que incluyen, por ejemplo, tumores cerebrales, ascitis asociadas con enfermedades malignas, síndrome de Meigs, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, derrame pericárdico, derrame

pleural, permeabilidad asociada con enfermedades cardiovasculares tales como la afección luego de infarto de miocardio y accidente cerebrovascular y similares.

Otras enfermedades dependientes de la angiogénesis de acuerdo con esta invención incluyen angiofibroma (sangre anormal de los vasos que son propensos al sangrado), glaucoma neovascular (crecimiento de vasos sanguíneos en el ojo), malformaciones arteriovenosas (comunicación anormal entre arterias y venas), no unión de fracturas (fracturas que no sanarán), placas ateroscleróticas (endurecimiento de las arterias), granuloma piogénico (lesión de la piel común compuesta por vasos sanguíneos), esclerodermia (una forma de enfermedad del tejido conectivo), hemangioma (tumor compuesto por vasos sanguíneos), tracoma (principal causa de ceguera en el tercer mundo), articulaciones hemofílicas, adhesiones vasculares y cicatrices hipertróficas (formación cicatricial anormal).

De acuerdo con la presente solicitud, el término "tratamiento" (y sus variaciones gramaticales, como "tratar") se refiere a la administración de un compuesto o de una composición farmacéutica con propósitos profilácticos o terapéuticos. El "tratamiento de una enfermedad" o el uso para el "tratamiento terapéutico" se refiere a la administración de tratamiento a un sujeto que ya sufre de una enfermedad, a fin de mejorar la afección del sujeto. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, sin limitación, la prevención de la recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de metástasis, la disminución del índice de avance de la enfermedad, el alivio o la paliación de la enfermedad, y la remisión, o el mejor pronóstico. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para demorar el desarrollo de una enfermedad, o para disminuir el avance de una enfermedad. Preferentemente, se diagnostica que el sujeto sufre de una enfermedad que tiene angiogénesis anormal, sobre la base de la identificación de cualquiera de los síntomas característicos que se describen a continuación, o el uso de los métodos de diagnóstico que se describen en esta solicitud. La "prevención de enfermedad" se refiere al tratamiento profiláctico de un sujeto que aún no ha enfermado, pero que es sensible a una enfermedad o presenta riesgo de manifestar una enfermedad

particular. Preferentemente, se determina que un sujeto presenta riesgo de manifestar una enfermedad que tiene angiogénesis anormal empleando los métodos de diagnóstico que se describen en la presente solicitud.

La expresión “tratar o aliviar” significa el alivio de una afección o de los síntomas de la afección antes o después de su inicio. En comparación con un control no tratado equivalente, dicho alivio o grado de tratamiento es por lo menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ó 100%, medido por cualquier técnica convencional.

Los términos “recurrencia” o “recaída” se refieren al retorno de un tipo de cáncer o de una enfermedad luego de la evaluación clínica de la desaparición de la enfermedad. Un diagnóstico de metástasis distante o recurrencia local puede considerarse una recaída.

El término “resistente” se refiere a la resistencia o a la falta de respuesta de una enfermedad o afección a un tratamiento (por ejemplo, la cantidad de células plasmáticas neoplásicas incrementa aun cuando se proporciona tratamiento). En ciertas realizaciones, el término “resistente” se refiere a la resistencia o a la falta de respuesta a cualquier tratamiento previo que incluye, sin limitación, antagonista de VEGF, agentes antiangiogénicos y tratamientos quimioterapéuticos. En ciertas realizaciones, el término “resistente” se refiere a una falta de respuesta intrínseca de una enfermedad o afección a cualquier tratamiento previo, que comprende un antagonista de VEGF, agentes antiangiogénicos o tratamiento de quimioterapia. En ciertas realizaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.

El término “recaída” se refiere a la regresión de la enfermedad del paciente nuevamente a su estado de enfermedad anterior, especialmente, el retorno de los síntomas luego de una recuperación aparente o recuperación parcial. En ciertas realizaciones, el estado de recaída se refiere al proceso de retorno o al retorno a la enfermedad antes del tratamiento previo, que incluye, sin limitación, antagonista de VEGF, agentes antiangiogénicos o tratamiento de quimioterapia. En ciertas realizaciones, el estado de recaída se refiere al proceso de retorno o al retorno a la enfermedad luego de una fuerte respuesta inicial a una terapia contra el cáncer, que comprende un antagonista de VEGF, agentes antiangiogénicos y tratamientos

quimioterapéuticos. En ciertas realizaciones, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.

El término "terapia complementaria" se refiere al tratamiento proporcionado después de la terapia primaria, habitualmente, la cirugía. La terapia complementaria para el cáncer o la enfermedad puede incluir terapia inmunitaria, quimioterapia, terapia de radiación o terapia hormonal.

El término "terapia de mantenimiento" se refiere al nuevo tratamiento programado que se proporciona a fin de ayudar a mantener los efectos de un tratamiento previo. La terapia de mantenimiento a menudo se proporciona a fin de ayudar a mantener el cáncer en remisión, o prolongar una respuesta a una terapia específica, sin consideración del avance de la enfermedad.

El término "cáncer invasivo" se refiere al cáncer que se ha diseminado más allá de la capa de tejido donde se inició, hacia los tejidos circundantes normales. Los tipos de cáncer invasivos pueden ser metastásicos o no metastásicos.

El término "cáncer no invasivo" se refiere a cáncer de etapa muy temprana, o a cáncer que no se ha diseminado más allá del tejido de origen.

El término "sobrevida libre de avance", en oncología, se refiere al período de tiempo durante el tratamiento y después del tratamiento, en que el cáncer no crece. La supervivencia libre de avance incluye el período de tiempo en que los pacientes han experimentado una respuesta completa o una respuesta parcial, al igual que el período de tiempo en que los pacientes han experimentado la enfermedad estable.

El término "enfermedad progresiva", en oncología, puede hacer referencia al crecimiento de un tumor de más del 20 por ciento desde el inicio de tratamiento —o bien debido a un incremento en la masa, o a una diseminación en el tumor.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiará con el tratamiento del anticuerpo, por ejemplo, en mamíferos que sufren de angiogénesis anormal o que necesitan profilaxis contra la angiogénesis anormal (angiogénesis excesiva, inapropiada o descontrolada) o la pérdida o permeabilidad vascular anormal. Esto incluye enfermedades y trastornos crónicos y agudos que abarcan aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Ejemplos no limitativos de trastornos por tratar en esta solicitud incluyen tumores malignos y benignos; enfermedades malignas no leucémicas y linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocíticos, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, trastornos macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

Los términos "cáncer" y "neoplásico" describen o se refieren a la afección fisiológica en mamíferos, típicamente caracterizada por el crecimiento celular no regulado. Ejemplos de tipos de cáncer incluyen, sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos tipos de cáncer incluyen cáncer de célula escamosa, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de la glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer de célula escamosa (por ejemplo, cáncer de célula escamosa epitelial), cáncer de próstata, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal, que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, tecomas, arrenoblastomas, hepatoma; enfermedades malignas hematológicas que incluyen linfoma no hodgkiniano (NHL), mieloma múltiple y enfermedades hematológicas agudas; carcinoma endometrial o uterino, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de la vulva, cáncer tiroideo, carcinomas esofágicos, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, carcinoma nasofaríngeo, carcinomas laríngeos, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas cutáneos, schwannoma, oligodendroglioma, neuroblastomas, rhabdomyosarcoma, sarcoma osteogénico, liomiosarcomas, carcinomas del tracto urinario, carcinomas tiroideos, tumor de Wilm, al igual que linfoma de células B (que incluye linfoma no hodgkiniano (NHL) folicular/de bajo grado; NHL linfocítico pequeño (SL, por sus siglas en inglés); NHL folicular/de

grado intermedio; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de célula no disociada pequeña de alto grado; NHL de tipo enfermedad voluminosa; linfoma de célula epitelial; linfoma relacionado con sida; y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés); leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés); tricoleucemia; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD, por sus siglas en inglés), al igual que la proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, y síndrome de Meigs.

El término "tumor", de acuerdo con esta solicitud, se refiere a todo crecimiento celular y toda proliferación neoplásicos, malignos o benignos, y a todas las células y los tejidos preneoplásicos y neoplásicos.

El término "composición antineoplásica" o "agente antineoplásico" se refiere a una composición útil en el tratamiento de cáncer, que comprende por lo menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, un "agente antineoplásico". Ejemplos de agentes terapéuticos (agentes antineoplásicos) incluyen, sin limitación, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes utilizados en terapia de radiación, agentes antiangiogénicos, agentes apoptóticos, agentes contra la tubulina y otros agentes para el tratamiento del cáncer, tales como anticuerpos anti-HER-2, anticuerpos anti-CD20, un antagonista del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR, según su sigla en inglés) (por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa), inhibidor de HER1/EGFR (por ejemplo, erlotinib (TarcevaTM), inhibidores de factores de crecimiento derivados de plaquetas (por ejemplo, GleevecTM (Imatinib mesilato)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citoquinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a uno o más de los siguientes blancos: ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BAFF, BR3, APRIL, BCMA o receptores VEGF, TRAIL/Apo2, y otros agentes bioactivos y químicos orgánicos, etc. Se contemplan también en esta invención las combinaciones de los anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento", utilizado en la presente solicitud, se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento o la

proliferación de una célula, ya sea *in vitro*, ya sea *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser un agente que reduce de manera significativa el porcentaje de células en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el avance del ciclo celular (en un lugar diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), TAXOL® y los inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorrubicina, epirrubicina, daunorrubicina, etoposida y bleomicina. Dichos agentes que detienen G1 también se vuelcan a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluoruracilo y ara-C. Puede hallarse información adicional en la referencia de Mendelsohn e Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, Capítulo 1, titulada "Regulación del ciclo celular, oncogenes y fármacos antineoplásicos", de Murakami *et al.* (W. B. Saunders, Philadelphia, 1995), especialmente, en la p. 13.

El término "agente citotóxico", de acuerdo con esta solicitud, se refiere a un agente que inhibe o previene la función de células, o causa la destrucción de células. El término tiene el propósito de incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes inhibidores del crecimiento, agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de plantas o animal, o sus fragmentos.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN® ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (en especial, bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecano); briostatina; calistatina; CC-1065 (que incluye sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y

criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, mecloretamina óxido clorhidrato, melfalano, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enediina (por ejemplo, caliqueamicina, en especial, caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omega11 (ver, por ejemplo, la referencia de Angew, *Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina, que incluye dinemicina A; bifosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; al igual que el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromaproteína enediina relacionados); aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina ADRIAMYCIN® (que incluye morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluoruracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; agentes antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; abastecedores de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid;

nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazonico; triaziquona; 2,2',2'-triclorotrietilamina; tricotecenos (en especial, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.), ABRAXANTEM libre de cromóforo, formulación de nanopartículas diseñada con albúmina, de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); cloranbucil; GEMZAR® gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® vinorelbina; novantrona; teniposida; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecano (Camptostar, CPT-11) (que incluye el régimen de tratamiento de irinotecano con 5-FU y leucovorina); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluormetilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabine; combrestatina; leucovorina (LV); oxaliplatino, que incluye el régimen de tratamiento de oxaliplatino (FOLFOX); inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras y EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™)) que reducen la proliferación celular; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Los agentes quimioterapéuticos además incluyen agentes antihormonales que actúan de manera de regular o inhibir la acción de las hormonas sobre tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM, por sus siglas en inglés), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (que incluye NOLVADEX® tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON toremifeno; inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que

regulan la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® megestrol acetato, AROMASIN® exemestano, formestano, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol y ARIMIDEX® anastrozol; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserrelina; al igual que troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, en particular, aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización que participan en la proliferación celular anormal, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME® ribozima) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas, tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN® inhibidor de la topoisomerasa 1; ABARELIX® rmRH; vinorelbina y esperamicinas (ver Patente de los Estados Unidos Nro. 4.675.187), y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

El término "profármaco", de acuerdo con la presente solicitud, se refiere a un precursor o una forma derivada de un agente farmacéuticamente activo (por ejemplo, una molécula pequeña) que es menos citotóxico para las células enfermas, en comparación con el fármaco original, y que es capaz de ser enzimáticamente activado o convertido en la forma original más activa. Ver, por ejemplo, las referencias de Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986); y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β -lactámicos, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida; profármacos de 5-fluorцитосина y otros profármacos de 5-fluoruridina que pueden

ser convertidos en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivarse hasta una forma de profármaco para el uso en esta invención incluyen, sin limitación, aquellos agentes quimioterapéuticos que se describen con anterioridad.

El término "aislado", utilizado para describir los diversos polipéptidos que se revelan en esta solicitud, significa polipéptido que ha sido identificado y separado, y/o recuperado de una célula o de un cultivo de células a partir del cual fue expresado. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que, habitualmente, interferirán con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En ciertas realizaciones, el polipéptido será purificado: (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria; o (2) hasta homogeneidad, por medio de SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no reductoras, usando azul de Coomassie, o, preferentemente, tinción de plata. Los polipéptidos aislados incluyen polipéptido *in situ* dentro de células recombinadas, ya que no se presentará por lo menos un componente del entorno natural del polipéptido. Sin embargo, comúnmente, el polipéptido aislado será preparado por medio de al menos una etapa de purificación.

Un ácido nucleico codificador de polipéptido "aislado" u otro ácido nucleico codificador de polipéptido es una molécula de ácido nucleico que es identificada y separada de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual se asocia comúnmente en la fuente natural del ácido nucleico codificador de polipéptido. Una molécula de ácido nucleico codificador de polipéptido aislada se presenta en una forma o configuración diferente de aquellas halladas en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico codificador de polipéptido aisladas, por lo tanto, se distinguen de la molécula de ácido nucleico codificador de polipéptido específica tal como se presenta en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico codificador de polipéptido aislada incluye moléculas de ácido nucleico codificador de polipéptido contenidas en células que comúnmente expresan el polipéptido, donde, por ejemplo, la molécula de ácido

nucleico se presenta en una ubicación cromosómica diferente de aquella de las células naturales.

El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificadora funcionalmente ligada en un organismo huésped particular. Las secuencias de control adecuadas para procariotos, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente, una secuencia de operador, y un sitio de unión de ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y mejoradores.

El ácido nucleico está "funcionalmente ligado" cuando se coloca en una relación funcional con respecto a otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o un líder de secreción está funcionalmente ligado a ADN para un polipéptido, si es expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o mejorador está funcionalmente ligado a una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de ribosoma está funcionalmente ligado a una secuencia codificadora si se ubica de manera de facilitar la traducción. En general, el término "funcionalmente ligado" significa que las secuencias de ADN ligadas son contiguas, y, en el caso de un líder de secreción, son contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los mejoradores no necesariamente deben ser contiguos. La unión se logra por medio de la ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores de oligonucleótidos sintéticos o conectores, de acuerdo con la práctica convencional.

Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se definen en esta solicitud, pueden identificarse como aquellas que: (1) emplean baja concentración iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo, cloruro de sodio, 0,015 M/citrato de sodio, 0,0015 M/0,1% de dodecil sulfato sódico, a 50°C; (2) emplean, durante la hibridación, un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, 50% (v/v) de formamida con 0,1% de albúmina de suero bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/regulador de fosfato de sodio, 50 mM, a pH 6,5, con cloruro de sodio, 750 mM; citrato de sodio, 75 mM, a 42°C; o (3) utilizan la hibridación durante la noche en una solución que emplea 50% de

formamida; 5 x SSC (NaCl, 0,75 M; citrato de sodio, 0,075 M); fosfato de sodio, 50 mM (pH 6,8); 0,1% de pirofosfato sódico; 5 x solución de Denhardt; ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml); 0,1% de SDS; y sulfato de dextrano al 10%, a 42°C, con un lavado de 10 minutos a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio), seguido de un lavado de 10 minutos de alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC con EDTA a 55°C.

Las secuencias de aminoácidos que se describen en esta solicitud son secuencias de aminoácidos contiguas, a menos que se establezca lo contrario.

De acuerdo con la presente solicitud, el término "inmuno adhesina" designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada, que es diferente del reconocimiento de antígeno y el sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina típicamente es una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende por lo menos el sitio de unión de un receptor o un ligando –tal como un VEGFR o un ligando de fibronectina. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG–1, IgG–2, IgG–3 o IgG–4, IgA (que incluye IgA–1 e IgA–2), IgE, IgD, o IgM. Los peptidocuerpos, que a menudo comprenden una secuencia derivada de la selección de exhibición de fagos de secuencias que se unen de manera específica a un blanco fusionado a una porción Fc de una inmunoglobulina, pueden considerarse inmuno adhesinas en la presente solicitud.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio, y específicamente, cubre, por ejemplo, anticuerpos monoclonales simples (que incluyen anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, antianticuerpos de cadena simple, y fragmentos de anticuerpos (ver a continuación), siempre que se unan de manera específica a un polipéptido nativo o exhiban una actividad inmunológica o

actividad biológica de esta invención. De acuerdo con una realización, el anticuerpo se une a una forma oligómera de una proteína blanco, por ejemplo, una forma trimérica. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo se une de manera específica a una proteína, cuya unión puede ser inhibida por un anticuerpo monoclonal de esta invención (por ejemplo, un anticuerpo depositado de esta invención, etc.). La frase "fragmento funcional o análogo" de un anticuerpo es un compuesto que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo al cual se refiere. Por ejemplo, un fragmento funcional o análogo de un anticuerpo de esta invención puede ser aquel que se une de manera específica a VEGF o $\alpha 5\beta 1$. En una realización, el anticuerpo puede prevenir o sustancialmente reducir la capacidad de un VEGF para inducir la proliferación celular.

Un anticuerpo "aislado" es aquel que ha sido identificado y separado, o recuperado, de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interfieren con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo será purificado: (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo, según lo determinado por el método de Lowry, y con mayor preferencia, hasta más del 99% en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminales o internos mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria; o (3) hasta homogeneidad, por medio de SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no reductoras, usando azul de Coomassie, o preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinadas, ya que no se presentará por lo menos un componente del entorno natural del anticuerpo. Sin embargo, comúnmente, el anticuerpo aislado se preparará por medio de al menos una etapa de purificación.

La unidad de anticuerpo básica de cuatro cadenas es una glicoproteína heterotetrámera compuesta por dos cadenas livianas (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de la unidad básica heterotetrámera junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y por lo

tanto, contiene 10 sitios de unión de antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar ensambles polivalentes que comprenden 2–5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de IgG, la unidad de 4 cadenas tiene generalmente alrededor de 150.000 daltones. Cada cadena L está ligada a una cadena H por medio de un enlace de disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están ligadas entre sí por uno o más enlaces de disulfuro, de acuerdo con el isotipo de cadena H. Cada cadena H y L además tiene puentes de disulfuro de intracadena regularmente espaciados. Cada cadena H tiene, en el término N, un dominio variable (V_H), seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ , y cuatro dominios C_H , para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene, en el término N, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L), en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H , y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena liviana y de cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L forma un sitio de unión de antígeno individual. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, ver, por ejemplo, la referencia titulada: BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, p. 71 and Chapter 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, sobre la base de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. De acuerdo con la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , γ , ϵ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen asimismo en subclases, sobre la base de diferencias relativamente menores en la función y secuencia de C_H , por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren extensamente en su secuencia, entre los anticuerpos. El dominio V media la unión de antígeno, y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye en forma pareja a través del tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones de marco (FR, por sus siglas en inglés) de 15–30 aminoácidos, separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables", donde, cada una, tiene 9–12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas livianas y pesadas nativas comprenden, cada uno, cuatro FR, y adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectados por tres regiones hipervariables, que forman anillas que conectan la estructura de lámina beta, y en algunos casos, forman parte de ella. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR, y con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión de antígeno de los anticuerpos (ver la referencia de Kabat *et al.*, *SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

El término "región hipervariable", utilizado en la presente solicitud, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión de antígeno. La región hipervariable comprende, en general, residuos de aminoácidos de una "región de determinación de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, alrededor de los residuos 24–34 (L1), 50–56 (L2) y 89–97 (L3) en la V_L , y alrededor de 31–35B (H1), 50–65 (H2) y 95–102 (H3), en la V_H (en una realización, H1 es alrededor de 31–35); Kabat *et al.*, *supra*, y/o aquellos residuos de una "anilla hipervariable" (por ejemplo, los residuos 26–32 (L1), 50–52 (L2) y

91–96 (L3), en la V_L , y 26–32 (H1), 53–55 (H2) y 96–101 (H3), en la V_H ; Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901–917 (1987)).

A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones, se usa generalmente la numeración de Kabat cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1–107 de la cadena liviana, y los residuos 1–113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, *supra* (1991)). Se usa generalmente el "sistema de numeración EU" o "índice EU" cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU informado en la referencia de Kabat *et al.*, *supra* (1991), incorporado expresamente en la presente solicitud a modo de referencia). A menos que se establezca lo contrario en esta solicitud, las referencias a los números de residuos en el dominio variable de los anticuerpos significa la numeración de residuos por el sistema de numeración Kabat. A menos que se establezca lo contrario en esta solicitud, las referencias a los números de residuos en el dominio constante de los anticuerpos significa la numeración de residuos por el sistema de numeración EU.

El término "anticuerpo monoclonal", de acuerdo con la presente solicitud, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto posibles mutaciones naturales que pueden presentarse en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y están dirigidos contra un sitio antigénico individual. Asimismo, en contraste a las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son convenientes en términos de que pueden ser sintetizados sin contaminación de otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como la necesidad de la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención pueden prepararse por medio de la metodología de hibridoma, descrita por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:

495 (1975); o pueden prepararse usando métodos biotecnológicos en células bacterianas, eucariotas, de animales o de plantas (ver, por ejemplo la Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" además pueden aislarse de genotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en la referencia de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624–628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581–597 (1991); o usando los métodos expuestos en los Ejemplos que siguen.

Los anticuerpos monoclonales de la presente solicitud incluyen anticuerpos "quiméricos", donde una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, al igual que fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban una actividad biológica de esta invención (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567; la referencia de Morrison *et al.*, *PNAS. USA*, 81: 6851–6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en esta invención incluyen anticuerpos "primatizados", que comprenden secuencias de unión de antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, cercopitécido, simio, etc.) y secuencias de región constante humanas.

Un anticuerpo "madurado para afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más de sus CDR, que logran una mejoría en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo progenitor que no posee dichas alteraciones. Los anticuerpos madurados para afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o aun picomolares para el antígeno blanco. Los anticuerpos madurados para afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en el arte. Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779–783 (1992), describen la maduración para afinidad por medio de la mezcla de dominios VH y VL. La mutagénesis de azar de residuos de marco y/o CDR es descripta por: Barbas *et al.*: *PNAS 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).

Un anticuerpo de "bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Por ejemplo, los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas anti- $\alpha 5\beta 1$ inhiben de manera parcial o completa la angiogénesis, mediante la unión a $\alpha 5\beta 1$.

Un "anticuerpo agonista" es un anticuerpo que mejora o aumenta la actividad biológica del antígeno al que se une. Por ejemplo, los anticuerpos agonistas anti- $\alpha 5\beta 1$ mejoran la angiogénesis mediante la unión a $\alpha 5\beta 1$.

Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende un sitio de unión de antígeno al igual que un C_L y por lo menos dominios constantes de cadena pesada, C_H1 , C_H2 y C_H3 . Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o sus variantes de secuencia de aminoácidos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente, la región variable o de unión de antígeno del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (ver Patente de los Estados Unidos Nro. 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8 (10): 1057–1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere generalmente a los anticuerpos descritos en la referencia de Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8 (10): 1057–1062 (1995). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd *in tandem* (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena liviana complementaria, forman un par de regiones de unión de antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

La digestión de papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión de antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad para cristalizarse fácilmente. El

fragmento Fab consiste en una cadena L entera junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión de antígeno, es decir, tiene un solo sitio de unión de antígeno. El tratamiento de pepsina de un anticuerpo produce un solo fragmento $F(ab')_2$ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por disulfuro que tienen actividad de unión de antígeno divalente, y que aun es capaz de entrecruzamiento con antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener algunos residuos adicionales en el término carboxi del dominio C_H1 , que incluyen una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación, en esta solicitud, para Fab' donde los residuos cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ originalmente fueron producidos como pares de fragmentos Fab' que tenían entre ellos cisteínas de bisagra. Se conocen asimismo otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxi-terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos son determinadas por secuencias en la región Fc, donde esta región también es también la parte reconocida por receptores Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de aquella de una región Fc de secuencia nativa en virtud de por lo menos una "modificación de aminoácido", como se define en esta solicitud. Preferentemente, la región Fc variante tiene por lo menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa, o con la región Fc de un polipéptido progenitor, por ejemplo, de alrededor de una a alrededor de diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente, de alrededor de una a alrededor de cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa, o en la región Fc del polipéptido progenitor. En una realización, la región Fc variante de la presente solicitud poseerá por lo menos alrededor de 80% de homología, por lo menos alrededor de 85% de homología, por lo menos

alrededor de 90% de homología, por lo menos alrededor de 95% de homología, o por lo menos alrededor de 99% de homología con respecto a una región Fc de secuencia nativa. De acuerdo con otra realización, la región Fc variante de la presente solicitud poseerá por lo menos aproximadamente 80% de homología, por lo menos aproximadamente 85% de homología, por lo menos aproximadamente 90% de homología, por lo menos aproximadamente 95% de homología, o por lo menos aproximadamente 99% de homología con respecto a una región Fc de un polipéptido progenitor.

El término "polipéptido que comprende región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o una inmunoadhesina (ver definiciones a continuación), que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede removerse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido, o por medio del diseño recombinado del ácido nucleico que codifica el polipéptido. En consecuencia, una composición que comprende polipéptidos, que incluyen anticuerpos, que tienen una región Fc de acuerdo con esta invención puede comprender poblaciones de polipéptidos con todos los residuos K447 removidos, poblaciones de polipéptidos sin residuos K447 removidos, o poblaciones de polipéptidos que tienen una mezcla de polipéptidos con el residuo K447 y sin el residuo K447.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión y reconocimiento de antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena liviana en asociación estrecha, no covalente. Del plegado de estos dos dominios emanan seis anillas hipervariables (3 anillas de cada cadena H y L) que contribuyen los residuos de aminoácidos para la unión de antígeno y confieren especificidad de unión de antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aun un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir antígeno, si bien con una menor afinidad que el sitio de unión entero.

Los "Fv de cadena simple", también abreviados como "scFv" o "sFv", son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo,

conectados en una sola cadena de polipéptido. Preferentemente, el polipéptido de sFv además comprende un conector de polipéptido entre los dominios V_H y V_L, lo que permite que el SFv forme la estructura deseada para la unión de antígeno. Para una reseña de sFv, ver las referencias de Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269–315; Borrebaeck, 1995, *infra*.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (ver el párrafo precedente) con conectores cortos (alrededor de 5–10 residuos) entre los dominios V_H y V_L, de modo de lograr el emparejamiento de intercadena, si bien no de intracadena, de los dominios V, a fin de obtener un fragmento bivalente, es decir, fragmento que tiene dos sitios de unión de antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv de "cruce", donde los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos se presentan en diferentes cadenas de polipéptidos. Los diacuerpos se describen en mayor detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y en la referencia de Hollinger *et al.* *PNAS USA*, 90: 6444–6448 (1993).

Los anticuerpos "humanizados" son formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) que son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) donde los residuos de una región hipervariable del receptor son reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseadas. En algunos casos, los residuos de región de marco (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por correspondientes residuos no humanos. Asimismo, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan a fin de refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de

por lo menos uno, y habitualmente, dos, dominios variables, donde la totalidad, o sustancialmente la totalidad de las anillas hipervariables corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado además comprenderá, opcionalmente, por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente, aquella de una inmunoglobulina humana. Para mayores detalles, ver las referencias de 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).

Un "anticuerpo dependiente de la especie" es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión más fuerte para un antígeno de una primera especie de mamífero, que para un homólogo de dicho antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie se "une de manera específica" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) no superior a alrededor de 1×10^{-7} M, no superior a alrededor de 1×10^{-8} , o no superior a alrededor de 1×10^{-9} M), si bien tiene una afinidad de unión para un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humana que es por lo menos aproximadamente 50 veces, 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 la especie puede ser de cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos que se definen con anterioridad, si bien, preferentemente, es un anticuerpo humanizado o humano.

En dichas realizaciones, el alcance de unión del polipéptido, anticuerpo, antagonista o de la composición a una proteína "no blanco" será inferior a aproximadamente 10% de la unión del polipéptido, anticuerpo, antagonista o de la composición a su proteína blanco particular, según lo determinado por el análisis de clasificación celular activado por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) o por la radioinmunoprecipitación (RIA, por sus siglas en inglés). Con respecto a la unión de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o una composición a una molécula blanco, el término "unión específica" o "se une de manera específica a", o "es específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un blanco de

polipéptido particular significa la unión que es mensurablemente diferente de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, mediante la determinación de la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que, en general, es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse por medio de la competición con una molécula de control que es similar al blanco, por ejemplo, un exceso de blanco no marcado. En este caso, la unión específica se indica si la unión del blanco marcado a una sonda es inhibida competitivamente por el exceso de blanco no marcado. El término "unión específica" o "se une de manera específica a", o "es específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un blanco de polipéptido particular, de acuerdo con esta solicitud, puede ser exhibido, por ejemplo, por una molécula que tiene un K_d para el blanco de por lo menos aproximadamente 10^{-4} M, por lo menos aproximadamente 10^{-5} M, por lo menos aproximadamente 10^{-6} M, por lo menos aproximadamente 10^{-7} M, por lo menos aproximadamente 10^{-8} M, por lo menos aproximadamente 10^{-9} M; alternativamente, por lo menos aproximadamente 10^{-10} M, por lo menos aproximadamente 10^{-11} M, por lo menos aproximadamente 10^{-12} M o más. En una realización, el término "unión específica" se refiere a la unión donde una molécula se une a un polipéptido particular o epítipo en un polipéptido particular sin la unión sustancial a cualquier otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: la unión C1q y la citotoxicidad dependiente de complemento; la unión de receptor Fc; la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés); la fagocitosis; la regulación descendente de receptores de superficie celular; y la activación de células B. Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc hallada en la naturaleza. Ejemplos de secuencias Fc se

describen, por ejemplo, sin limitación, en la referencia de Kabat *et al.*, *supra* (1991).

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos", u "homología", con respecto a las secuencias de anticuerpos y polipéptidos identificadas en esta invención se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en el polipéptido comparado, luego de la alineación de las secuencias considerando cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación, para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos, puede lograrse de diversas maneras, que se encuentran dentro de la experiencia del arte, por ejemplo, usando programas informáticos de libre disponibilidad tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en el arte pueden determinar los parámetros apropiados para la alineación de secuencias, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima alineación sobre la longitud total de las secuencias comparadas. Sin embargo, para los propósitos de la presente invención, los valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos son generados usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue diseñado por Genentech, Inc., y se ha presentado el código de fuente con documentación del usuario en la Oficina de Copyright de los Estados Unidos de América, Washington D. C., 20559, donde se encuentra registrado bajo el Registro U. S. Copyright Nro. TXU510087. El programa ALIGN-2 es de libre acceso al público en Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debe ser compilado para el uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente, UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

Los términos "receptor Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En una realización, un FcR de esta invención es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas

y, alternativamente, formas empalmadas de dichos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor activador") y Fc γ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor activador Fc γ RIIA contiene un motivo de activación a base de tirosina de inmunorreceptor (ITAM, por sus siglas en inglés) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición a base de tirosina de inmunorreceptor (ITIM, por sus siglas en inglés) en su dominio citoplásmico (ver la reseña de Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203–234 (1997)). El término comprende alotipos, tales como alotipos de FC γ RIIA: Fc γ RIIA–Phe158, Fc γ RIIA–Val158, Fc γ RIIA–R131 y Fc γ RIIA–H131. Los FcR son reseñados en las referencias de 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 por ser identificados en el futuro, están contemplados por el término "FcR" en esta solicitud. El término además comprende el receptor neonato FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.*, 117: 587 (1976), y Kim *et al.*, *J. Immunol.*, 24: 249 (1994)).

El término "FcRn" se refiere al receptor Fc neonato (FcRn). FcRn es estructuralmente similar al complejo de histocompatibilidad mayor (MHC, por sus siglas en inglés), y consiste en una cadena $\forall$ unida en forma no covalente a $\exists$ 2–microglobulina. Las múltiples funciones del receptor Fc neonato FcRn son reseñadas en la referencia de Ghetie y Ward (2000): *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 739–766. FcRn cumple un rol en el suministro pasivo de inmunoglobulinas IgG de madre a hijo, y en la regulación de las concentraciones séricas de IgG. FcRn puede actuar como un receptor de rescate, mediante la unión y el transporte de IgG pinocitosadas en forma intacta, tanto dentro de las células como a través de ellas, y su rescate de una vía degradante por defecto.

El documento WO 00/42072 (Presta) y la referencia de Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9 (2): 6591–6604 (2001) describen variantes de anticuerpos con mayor o menor unión a FcR. Los contenidos de dichas publicaciones se incorporan específicamente en la presente solicitud a modo de referencia.

El "dominio CH1" de una región Fc de IgG humana (también denominado "C1" de dominio "H1") habitualmente se extiende desde alrededor del aminoácido 118 hasta alrededor del aminoácido 215 (sistema de numeración EU).

La "región de bisagra" se define generalmente como un tramo que se extiende desde Glu216 hasta Pro230 IgG1 humana (Burton, *Molec. Immunol.*, 22: 161–206 (1985)). Las regiones de bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia IgG1 mediante la colocación del primer y el último residuos cisteína que forman enlaces S–S de intercadena pesada, en las mismas posiciones.

La "región de bisagra inferior" de una región Fc normalmente se define como el tramo de residuos inmediatamente C-terminal con respecto a la región de bisagra, es decir, los residuos 233 a 239 de la región Fc. En informes previos, la unión de FcR se atribuía generalmente a los residuos de aminoácidos en la región de bisagra inferior de una región Fc de IgG.

El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana (también denominado "C2" de dominio "H2") habitualmente se extiende desde alrededor del aminoácido 231 hasta alrededor del aminoácido 340. El dominio CH2 es de carácter único, en términos de que no está cercanamente emparejado con otro dominio. En cambio, se interponen dos cadenas de carbohidrato ramificadas N-ligadas, entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. Se cree que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento de dominio–dominio, y ayudar a la estabilización del dominio CH2. Ver la referencia de Burton, *Molec. Immunol.*, 22: 161–206 (1985).

El "dominio CH3" (también denominado dominio "C2" o "H3") comprende el tramo de residuos C-terminales con respecto a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde alrededor del residuo de aminoácido 341 hasta el extremo C-terminal de una secuencia de anticuerpo, típicamente, en el residuo de aminoácido 446 ó 447 de una IgG).

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Ejemplos de "funciones efectoras" incluyen la unión de C1q; la citotoxicidad dependiente de complemento; la unión de receptor Fc; la

citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); la fagocitosis; la regulación descendente de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de célula B (BCR, por sus siglas en inglés)), etc. Dichas funciones efectoras requieren generalmente la combinación de la región Fc con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo), y pueden evaluarse usando diversos ensayos, por ejemplo, como se describen en la presente solicitud.

El "C1q" es un polipéptido que incluye un sitio de unión para la región Fc de una inmunoglobulina. C1q junto con dos serina proteasas, C1r y C1s, forma el complejo C1, el primer componente de la vía de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). C1q humano puede obtenerse en el mercado, por ejemplo, en Quidel, San Diego, CA.

El término "dominio de unión" se refiere a la región de un polipéptido que se une a otra molécula. En el caso de un FcR, el dominio de unión puede comprender una porción de una cadena de polipéptido de este (por ejemplo, su cadena alfa), que es responsable de la unión de una región Fc. Un dominio de unión útil es el dominio extracelular de una cadena alfa de FcR.

Un anticuerpo o pepticuerpo con una Fc de IgG variante con "alterada" afinidad de unión FcR o actividad ADCC es aquel que tiene o bien mayor o menor actividad de unión de FcR (por ejemplo, FcγR o FcRn) o actividad ADCC, en comparación con un polipéptido progenitor o con un polipéptido que comprende una región Fc de secuencia nativa. La Fc variante que "exhibe mayor unión" a un FcR se une por lo menos a un FcR con mayor afinidad (por ejemplo, menor K_d aparente o valor IC₅₀) que el polipéptido progenitor o una Fc de IgG de secuencia nativa. De acuerdo con algunas realizaciones, el aumento en la unión en comparación con un polipéptido progenitor es de alrededor de 3 veces, preferentemente, alrededor de 5, 10, 25, 50, 60, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, ó 500 veces, o de alrededor del 25% a 1000% de mayor unión. La variante de polipéptido que "exhibe menor unión" a un FcR se une a por lo menos un FcR con menor afinidad (por ejemplo, mayor K_d aparente o mayor valor IC₅₀) que un polipéptido progenitor. La disminución en la unión en comparación con un

polipéptido progenitor puede ser de alrededor del 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, o más de disminución en la unión.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual Ig secretada unida a receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula blanco que porta antígeno, y a continuación, maten la célula blanco con citotoxinas. Los anticuerpos "atacan" a las células citotóxicas, y son absolutamente necesarios para dicha muerte. Las células primarias para la mediación de ADCC, linfocitos citolíticos naturales, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3, página 464, de la referencia de Ravetch y Kinet: *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457–92 (1991). A fin de evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede efectuarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como aquel descrito en las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.500.362 ó 5.821.337; o en los Ejemplos expuestos a continuación. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede ensayarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como aquel revelado en la referencia de Clynes *et al.* *PNAS*, 95: 652–656 (1998).

El polipéptido que comprende una región Fc variante que "exhibe mayor ADCC" o media la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) en presencia de células efectoras humanas en forma más eficaz que un polipéptido que tiene Fc de IgG de tipo silvestre o un polipéptido progenitor es aquel que, *in vitro* o *in vivo*, es sustancialmente más eficaz en la mediación de ADCC, cuando las cantidades de polipéptido con región Fc variante y el polipéptido con región Fc de tipo silvestre (o el polipéptido progenitor) en el ensayo son esencialmente iguales. En general, dichas variantes serán identificadas usando el ensayo de ADCC *in vitro*, como se revela en esta solicitud, si bien se contemplan otros ensayos o métodos para la determinación de la actividad ADCC,

por ejemplo, en un modelo animal, etc. En una realización, la variante preferida es de alrededor de 5 veces a alrededor de 100 veces, por ejemplo, de alrededor de 25 a alrededor de 50 veces más eficaz en la mediación de ADCC, en comparación con la Fc de tipo silvestre (o polipéptido progenitor).

La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula blanco en presencia de complemento. La activación de la vía de complemento clásica se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada), que están unidos a su antígeno cognado. A fin de evaluar la activación de complemento, puede efectuarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en la referencia de Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 202: 163 (1996).

Las variantes de polipéptido con secuencias alteradas de aminoácidos de región Fc y mayor o menor capacidad de unión C1q se describen en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.194.551 y en el documento WO 1999/51642. Los contenidos de dichas publicaciones de patente se incorporan específicamente en esta solicitud a modo de referencia. Ver, además, la referencia de Idusogie *et al.* *J. Immunol.*, 164: 4178–4184 (2000).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. De acuerdo con una realización, las células expresan por lo menos FcγRIII y realizan funciones efectoras ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), linfocitos citolíticos naturales (NK, por sus siglas en inglés), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos, preferentemente, PBMC y células NK. Las células efectoras pueden ser aisladas de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre o PBMC, como se describe en esta solicitud.

Los métodos para la medición de la unión a FcRn son conocidos (ver, por ejemplo, las referencias de Ghetie, 1997; Hinton, 2004). La unión a FcRn humano *in vivo* y la semivida sérica de polipéptidos de unión de alta afinidad de FcRn humano pueden ensayarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o en estirpes

celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los cuales se administran los polipéptidos de Fc variante. En una realización, específicamente, los anticuerpos anti- $\alpha 5 \beta 1$ de la invención que tienen una Fc de IgG variante exhiben mayor afinidad de unión para FcRn humano, en comparación con un polipéptido que tiene Fc de IgG de tipo silvestre, de al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, al menos 100 veces, al menos 125 veces, al menos 150 veces mayor. En una realización específica, la afinidad de unión para FcRn humano se incrementa alrededor de 170 veces.

Para la afinidad de unión a FcRn, en una realización, el EC50 o Kd aparente (a pH 6,0) del polipéptido es inferior a 1 μ M, más preferentemente, inferior o igual a 100 nM, más preferentemente, inferior o igual a 10 nM. En una realización, para la mayor afinidad de unión a Fc γ RIII (F158; es decir, isotipo de baja afinidad), el EC50 o Kd aparente es inferior o igual a 10 nM, y para Fc γ RIII (V158; isotipo de alta afinidad), el EC50 o Kd aparente es inferior o igual a 3 nM. De acuerdo con otra realización, una reducción en la unión de un anticuerpo a un receptor Fc en relación con un anticuerpo de control (por ejemplo, el anticuerpo Herceptin®) puede considerarse significativa en relación con el anticuerpo de control si la relación de los valores de las absorbancias en los puntos medios de las curvas de unión de anticuerpo de ensayo y anticuerpo de control (por ejemplo, $A_{450 \text{ nm}}(\text{anticuerpo})/A_{450 \text{ nm}}(\text{control Ab})$) es inferior o igual a 40%. De acuerdo con otra realización, un incremento en la unión de un anticuerpo a un receptor Fc en relación con un anticuerpo de control (por ejemplo, el anticuerpo Herceptin®) puede considerarse significativa en relación con el anticuerpo de control si la relación de los valores de las absorbancias en los puntos medios de las curvas de unión de anticuerpo de ensayo y anticuerpo de control (por ejemplo, $A_{450 \text{ nm}}(\text{anticuerpo})/A_{450 \text{ nm}}(\text{control Ab})$) es superior o igual a 125%.

Un "polipéptido progenitor" o "anticuerpo progenitor" es un polipéptido o anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la cual surgieron el anticuerpo o polipéptido variante y contra la cual el anticuerpo o polipéptido variante se compara. Típicamente, el anticuerpo progenitor o polipéptido

progenitor carece de una o más de las modificaciones de región Fc reveladas en esta solicitud, y difiere en la función efectora en comparación con una variante de polipéptido como se revela en esta solicitud. El polipéptido progenitor puede comprender una región Fc de secuencia nativa o una región Fc con modificaciones de secuencia de aminoácidos preexistentes (tales como adiciones, deleciones o sustituciones).

Los anticuerpos de esta invención pueden derivarse a partir de la exhibición de fagos. De acuerdo con esta solicitud, "genoteca" se refiere a una pluralidad de secuencias de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, o los ácidos nucleicos que codifican estas secuencias, donde las secuencias son diferentes en la combinación de aminoácidos variantes que se introducen en estas secuencias, de acuerdo con los métodos de la invención.

La "exhibición de fagos" es una técnica por la cual se exhiben polipéptidos variantes como proteínas de fusión, a por lo menos una porción de proteína de cobertura sobre la superficie de fagos, por ejemplo, fagos filamentosos, partículas. Una utilidad de la exhibición de fagos se encuentra en el hecho de que pueden clasificarse en forma rápida y eficaz grandes genotecas de variantes de proteínas aleatorizadas, a fin de identificar aquellas secuencias que se unen a un antígeno blanco con alta afinidad. La exhibición de genotecas de péptidos y proteínas en fagos se ha utilizado para la identificación sistemática de millones de polipéptidos para la identificación de aquellos con propiedades de unión específica. Se han utilizado métodos de exhibición de fagos polivalentes para la exhibición de péptidos aleatorios pequeños y proteínas pequeñas a través de fusiones o bien al gen III o al gen VIII de fagos filamentosos. Wells y Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3: 355–362 (1992), y referencias allí citadas. En una exhibición de fagos monovalentes, se fusiona una genoteca de proteínas o péptidos a un gen III o una porción de este, y se expresa en bajas concentraciones en presencia de proteína de gen III de tipo silvestre, de modo que las partículas de fagos exhiban una copia o ninguna de las proteínas de fusión. Los efectos de afinidad son reducidos en relación con fago polivalente, de modo que la clasificación es sobre la base de la afinidad de ligando intrínseca, y se usan vectores fagémidos, que simplifican las

manipulaciones de ADN. Lowman y Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3: 205–0216 (1991).

Un "fagémido" es un vector plásmido que tiene un origen de replicación bacteriano, por ejemplo, Co1E1, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémido puede usarse en cualquier bacteriófago conocido, por ejemplo, bacteriófago filamentoso y bacteriófago lambdoide. Además, el plásmido contendrá generalmente un marcador de selección para la resistencia a antibiótico. Los segmentos de ADN clonados en estos vectores pueden propagarse como plásmidos. Cuando se proveen células que albergan estos vectores, con todos los genes necesarios para la producción de partículas de fagos, el modo de replicación del plásmido cambia a la replicación en círculo rodante, a fin de generar copias de una hebra del ADN plásmido y partículas de fagos de paquete. El fagémido puede formar partículas de fagos infecciosas o no infecciosas. Este término incluye fagémidos que contienen un gen de proteína de cobertura de fago, o su fragmento, ligado a un gen de polipéptido heterólogo como una fusión de gen, de modo que el polipéptido heterólogo es exhibido sobre la superficie de la partícula de fago.

El término "vector de fago" significa una forma replicadora de doble hebra de un bacteriófago, que contiene un gen heterólogo y es capaz de replicación. El vector de fago tiene un origen de replicación de fago que permite la replicación de fago y la formación de partícula de fago. Preferentemente, el fago es un bacteriófago filamentoso, tal como un fago M13, fl, fd, Pf3 o uno de sus derivados, o un fago lambdoide, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc. o uno de sus derivados.

Las modificaciones covalentes de polipéptidos, tales como peptidocuerpos, inmunoadhesinas, anticuerpos y péptidos cortos, se incluyen dentro del alcance de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos blanco de un polipéptido, con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N– o C–terminales del polipéptido. La derivación con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para el entrecruzamiento del polipéptido con una superficie o matriz

de soporte insoluble en agua, para el uso en el método de purificación de anticuerpos, y viceversa. Los agentes de entrecruzamiento utilizados comúnmente incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxi-succinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluyen ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis-(succinimidil-propionato), maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)-ditio]propioimidato.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutaminilo y asparaginilo hasta los correspondientes residuos glutamilo y aspártico, respectivamente; la hidroxilación de prolina y lisina; la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo y treonilo; la metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)]; la acetilación de la amina N-terminal; y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otras modificaciones incluyen la conjugación de toxinas con los antagonistas, como maitansina y maitansinoides, caliqueamicina y otros agentes citotóxicos.

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido comprende la unión del polipéptido a uno de una diversidad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las Patentes de los Estados Unidos Nros. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

El polipéptido de la presente invención además puede ser modificado, si es conveniente, de modo de formar una molécula quimérica que comprende el polipéptido fusionado a otro, polipéptido heterólogo o una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, inmunoadhesinas o peptidocuerpos).

En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido con un dominio de transducción de proteína que dirige el polipéptido para el suministro a diversos tejidos, y más en particular, a través de la barrera

hematoencefálica, usando, por ejemplo, el dominio de transducción de proteína de la proteína TAT del virus de inmunodeficiencia humana (Schwarze *et al.*, 1999, *Science* 285: 1569–72).

En otra realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido con un polipéptido de marca que provee un epítipo al cual puede unirse selectivamente un anticuerpo antimarca. La marca de epítipo generalmente se coloca en el término amino o carboxilo del polipéptido. La presencia de dichas formas marcadas con epítipo del polipéptido puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido de marca. Además, la provisión de la marca de epítipo permite que el polipéptido sea rápidamente purificado por medio de la purificación de afinidad, usando un anticuerpo antimarca u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la marca de epítipo. Se conocen en el arte diversos polipéptidos de marca y sus respectivos anticuerpos. Ejemplos incluyen las marcas de polihistidina (poli-His) o poli-histidina-glicina (poli-His-gly; el polipéptido de marca HA de la influenza y su anticuerpo 12CA5 [Field *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2159–2165 (1988)]; la marca c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para dicha marca [Evan *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3610–3616 (1985)]; y la marca de glicoproteína D del virus de herpes simple (gD) y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, *Protein Engineering*, 3 (6): 547–553 (1990)]. Otros polipéptidos de marca incluyen el péptido Flag [Hopp *et al.*, *BioTechnology*, 6: 1204–1210 (1988)]; el péptido de epítipo KT3 [Martin *et al.*, *Science*, 255: 192–194 (1992)]; un péptido de epítipo de α -tubulina [Skinner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266: 15163–15166 (1991)]; y la marca de péptido de proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth *et al.*, *PNAS USA*, 87: 6393–6397 (1990)].

En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del polipéptido con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (por ejemplo, una "inmuno adhesina"), dicha fusión podría ser a la región Fc de una molécula IgG. Las fusiones Ig de esta invención incluyen polipéptidos que comprenden aproximadamente los residuos 94–243, los residuos 33–53 o los residuos 33–52, o solos dichos residuos, de humano, en lugar de por lo menos una región variable

dentro de una molécula Ig. En una realización particular, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH2 y CH3, o la bisagra, regiones CH1, CH2 y CH3 de una molécula IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina, ver, además, la Patente de los Estados Unidos Nro. 5.428.130.

La invención provee métodos y composiciones para la inhibición o prevención del crecimiento tumoral de recaída o el crecimiento de células neoplásicas de recaída. En diversas realizaciones, un cáncer es crecimiento tumoral de recaída o crecimiento de células neoplásicas de recaída cuando la cantidad de células neoplásicas no ha sido significativamente reducida, o ha incrementado, o el tamaño del tumor no se ha reducido en forma significativa, o ha incrementado, o cuando fracasa cualquier reducción adicional de tamaño o de la cantidad de células neoplásicas. La determinación del tipo de células neoplásicas, a decir, crecimiento tumoral de recaída o crecimiento de células neoplásicas de recaída, puede efectuarse o bien *in vivo* o *in vitro*, por cualquier método conocido en el arte para el ensayo de la eficacia de tratamiento en células neoplásicas. Un tumor resistente al tratamiento anti-VEGF es un ejemplo de un crecimiento tumoral de recaída.

Una "cantidad eficaz" de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o de una composición como se describe en esta solicitud es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito específicamente establecido. Una "cantidad eficaz" puede determinarse empíricamente, y por métodos conocidos que se relacionan con el propósito establecido.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, o antagonista de esta invención, eficaz para "tratar" una enfermedad o un trastorno en un mamífero (paciente). En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir la cantidad de células neoplásicas; puede reducir el tamaño del tumor o su peso; inhibir (es decir, disminuir hasta cierto alcance y, preferentemente, detener) la infiltración de células neoplásicas en órganos periféricos; inhibir (es decir, disminuir hasta cierto alcance y, preferentemente, detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto alcance, el crecimiento tumoral; y aliviar hasta cierto alcance uno o más de los síntomas

asociados con el cáncer. Hasta el punto en que el fármaco puede prevenir el crecimiento o matar células neoplásicas existentes, el fármaco puede ser citostático o citotóxico. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad inhibitoria del crecimiento. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que extiende la sobrevida de un paciente. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que mejora la sobrevida de un paciente libre de avance.

En el caso de la curación de heridas, el término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco, eficaz para acelerar o mejorar la curación de heridas en un sujeto. Una dosis terapéutica es una dosis que exhibe un efecto terapéutico en el paciente, y una dosis subterapéutica es una dosis que no exhibe un efecto terapéutico en el paciente tratado.

Una "herida crónica" se refiere a una herida que no sana. Ver, por ejemplo, la referencia de Lazarus *et al.*, "Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing", *Arch. Dermatol.*, 130: 489–93 (1994). Las heridas crónicas incluyen, sin limitación, úlceras arteriales, úlceras diabéticas, úlceras de presión, úlceras venosas, etc. Una herida aguda puede avanzar hasta una herida crónica. Las heridas agudas incluyen, sin limitación, heridas causadas, por ejemplo, por lesiones térmicas, traumatismo, cirugía, extirpación de cáncer de piel extenso, infecciones bacterianas y fúngicas profundas, vasculitis, esclerodermia, pénfigo, necrólisis epidérmica tóxica, etc. Ver, por ejemplo, la referencia de Buford, *Wound Healing and Pressure Sores*, HealingWell.com, publicada el 24 de octubre de 2001. Una "herida normal" se refiere a una herida que transita una reparación de curación de herida normal.

Una "cantidad inhibitoria del crecimiento" de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o de una composición de esta invención es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, en especial, una célula tumoral, por ejemplo, neoplásica, o bien *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad inhibitoria del crecimiento" de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o una composición de esta invención, para los propósitos de inhibir el crecimiento de células neoplásicas, puede determinarse

empíricamente y por métodos conocidos o por medio de los ejemplos que se proveen en esta solicitud.

Una "cantidad citotóxica" de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o de una composición de esta invención es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, en especial, una célula tumoral, por ejemplo, neoplásica, o bien *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad citotóxica" de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o de una composición de esta invención, para los propósitos de inhibir el crecimiento de células neoplásicas, puede determinarse empíricamente y por métodos conocidos en el arte.

Una "enfermedad autoinmunitaria", en esta solicitud, es una enfermedad o un trastorno que surge de los propios tejidos del individuo, y se dirige contra ellos, o una manifestación cosegregada de dicha enfermedad o dicho trastorno, o afección resultante de ellos. Ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, sin limitación, artritis (artritis reumatoide tal como artritis aguda, artritis reumatoide crónica, artritis gotosa, artritis gotosa aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis soriásica, artritis vertebral y artritis reumatoide de inicio juvenil; artrosis; artritis crónica progrediente, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva y espondiloartritis anquilosante); enfermedades de la piel hiperproliferativas inflamatorias, soriasis tal como soriasis plaquetaria, soriasis en gotas, soriasis pustular y soriasis de las uñas; dermatitis, que incluye dermatitis de contacto, dermatitis de contacto crónica, dermatitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, dermatitis herpetiforme y dermatitis atópica; síndrome de hiper-IgM x-ligado; urticaria, tal como urticaria idiopática crónica, que incluye urticaria autoinmunitaria crónica; polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrólisis epidérmica tóxica, esclerodermia (que incluye esclerodermia sistémica), esclerosis, tal como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (EM) tal como EM espino-óptica, EM progresiva primaria y EM de recaída y remisión; esclerosis sistémica progresiva, ateroesclerosis, arterioesclerosis, esclerosis diseminada y esclerosis atáxica; enfermedad intestinal inflamatoria (EII) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis, tal como colitis ulcerante, colitis ulcerosa, colitis

microscópica, colitis colagenosa, colitis poliposa, enterocolitis necrosante y colitis transmural; y enfermedad intestinal autoinmunitaria); piodermia gangrenosa, eritema nudoso, colangitis esclerosante primaria, epiescleritis); síndrome de insuficiencia respiratoria, que incluye el síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto o agudo (ARDS, por sus siglas en inglés); meningitis; inflamación de la totalidad o parte de la úvea; iritis, coroiditis; un trastorno hematológico autoinmunitario; espondiloartritis reumatoide, pérdida de cabello repentina, enfermedades mediadas por IgE, tales como anafilaxis y rinitis alérgica y atópica, encefalitis, tal como encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbica o del tronco encefálico; uveítis, tal como uveítis anterior, uveítis anterior aguda, uveítis granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis facoantigénica, uveítis posterior, o uveítis autoinmunitaria; glomerulonefritis (GN) con síndrome nefrótico o sin síndrome nefrótico, tal como glomerulonefritis crónico o agudo, tal como GN primaria, GN mediado por la inmunidad, GN membranosa (nefropatía membranosa), GN membranosa idiopática, GN proliferativa membranosa (MPGN, por sus siglas en inglés), que incluye GN tipo I y tipo II, y GN de rápido avance; afecciones alérgicas, reacción alérgica; eccema, que incluye eccema alérgico o atópico; asma, tal como asma bronquial y asma autoinmunitaria; afecciones que involucran la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas; enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, miocarditis autoinmunitaria; deficiencia de adhesión leucocitaria; lupus eritematoso sistémico (LES) o lupus sistémico de eritema, tal como LES cutáneo, lupus eritematoso cutáneo subagudo, síndrome de lupus del neonato (NLE, por sus siglas en inglés), lupus eritematoso diseminado, lupus (que incluye nefritis, cerebritis, pediátrico, no renal, discoide, alopecia), diabetes sacarina de inicio juvenil (tipo I), que incluye diabetes sacarina insulín dependiente (IDDM) pediátrica, diabetes sacarina de inicio en el adulto (diabetes tipo II), diabetes autoinmunitaria, diabetes insípida idiopática, respuestas inmunitarias asociadas con la hipersensibilidad aguda y demorada mediada por citoquinas y linfocitos T; tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis, que incluye granulomatosis linfomatoide, granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis, que incluye vasculitis (que incluye vasculitis de los vasos grandes (por

ejemplo, polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de los vasos medianos (que incluye la enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nudosa), poliarteritis microscópica, vasculitis del SNC, vasculitis necrosante, cutáneo o de hipersensibilidad, vasculitis necrosante sistémica, y vasculitis asociada con ANCA (sigla en inglés de "autoanticuerpos citoplásmicos antineutrófilos"), tal como vasculitis o síndrome de Churg–Strauss (CSS, por sus siglas en inglés)); arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmunitaria, anemia positiva de Coombs, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmunitaria que incluye anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA, por sus siglas en inglés), anemia perniciosa, enfermedad de Addison, anemia eritrocitaria pura o aplasia (PRCA, por sus siglas en inglés), deficiencia de Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que involucran diapédesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome de lesión de órganos múltiples, por ejemplo, aquellos secundarios a la septicemia, al traumatismo o a la hemorragia; enfermedades mediadas por el complejo de antígeno–anticuerpo; enfermedad de la membrana basal antiglomerular; síndrome de anticuerpo antifosfolípido; neuritis alérgica, enfermedad de Bechet o Behcet; síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjogren, síndrome de Stevens–Johnson; penfigoide, tal como penfigoide ampolloso y penfigoide cutáneo; pénfigo (que incluye pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigo penfigoide de la membrana mucosa y pénfigo eritematoso); poliendocrinopatías autoinmunitarias; enfermedad o síndrome de Reiter; nefritis de complejo inmunitario, nefritis mediada por anticuerpos, neuropatía crónica, tal como polineuropatías de IgM o neuropatía mediada por IgM; trombocitopenia (tal como la desarrollada por pacientes de infarto de miocardio), que incluye púrpura trombocitopénica trombótica (TTP, por sus siglas en inglés) y trombocitopenia autoinmunitaria o mediada por la inmunidad, tal como púrpura trombocitopénica idiopática (ITP, por sus siglas en inglés), que incluye ITP crónica o aguda; enfermedades autoinmunitarias de los testículos y los ovarios, que incluyen orquitis y ovaritis autoinmunitarias, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas

autoinmunitarias, que incluyen tiroiditis, tal como tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), o tiroiditis subaguda, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares, tales como síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), síndromes paraneoplásicos, que incluyen síndromes paraneoplásicos neurológicos tales como el síndrome miasténico de Lambert–Eaton o síndrome de Eaton–Lambert; síndrome de hombre o persona rígida; encefalomiелitis, tales como encefalomiелitis alérgica o encefalomiелitis de alergia y encefalimiелitis alérgica experimental (EAE), miastenia grave, degeneración cerebelar, neuromiotonía, opsoclono o síndrome de mioclono opsoclono (OMS, por sus siglas en inglés), y neuropatía sensorial; síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis de células gigantes, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmunitaria; neumonitis intersticial linfoide, bronquiолitis obliterante (no trasplante) comparada con NSIP (sigla en inglés de "neumonía intersticial no específica"); síndrome de Guillain–Barré, enfermedad de Berger (nefropatía de IgA), nefropatía de IgA idiopática, dermatosis de IgA lineal, cirrosis biliar primaria, neumonocirrosis, síndrome de enteropatía autoinmunitaria, enfermedad celíaca, celiaquía, estomatitis celíaca (enteropatía del gluten), estomatitis resistente, estomatitis idiopática; crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA; enfermedad de Lou Gehrig), arteriopatía coronaria, enfermedad del oído interno autoinmunitaria (AIED, por sus siglas en inglés) o pérdida de la audición autoinmunitaria, síndrome de mioclono opsoclono (OMS, por sus siglas en inglés), policondritis tal como policondritis resistente o de recaída; proteinosis alveolar pulmonar, amiloidosis, escleritis; una linfocitosis no neoplásica, una linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de célula B monoclonal (por ejemplo, gammopatía monoclonal benigna y gamopatía monoclonal de significación indeterminada, MGUS, por sus siglas en inglés); neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica y canalopatías del SNC; autismo, miopatía inflamatoria, glomeruloesclerosis

segmental focal (FSGS, por sus siglas en inglés), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, coriorretinitis; trastorno hepatológico autoinmunitario; fibromialgia, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, suprarrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes tales como enfermedades desmielinizantes autoinmunitarias; nefropatía diabética, síndrome de Dressler; alopecia circunscrita, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmunitaria masculina y femenina, enfermedad del tejido conectivo mixta, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón del campesino, eritema multiforme, síndrome poscardiotomía, síndrome de Cushing, neumopatía de los avicultores, angiitis granulomatosa alérgica, angiitis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis, tal como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante; enfermedad pulmonar intersticial, reacción de transfusión, lepra, malaria, leishmaniosis, quipanosomiasis, esquistosomiasis, ascariosis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, endoftalmitis, eritema elevado diutino, eritroblastosis fetal, fascitis eosinófila, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, tal como ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis o ciclitis de Fuch; púrpura de Henoch–Schonlein, infección del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), infección de ecovirus, miocardiopatía, enfermedad de Alzheimer, infección de parvovirus, infección del virus de la rubéola, síndromes posvacunación, infección de rubéola congénita, infección del virus de Epstein–Barr, paperas, síndrome de Evan, insuficiencia gonadal autoinmunitaria, corea de Sydenham, nefritis posestreptocócica, tromboangitis obliterante, tirotoxicosis, tabes dorsal, corioiditis, polimialgia de células gigantes, oftalmopatía endocrina, neumonitis hipersensible crónica, queratoconjuntivitis seca, queratoconjuntivitis epidémica, síndrome nefrítico idiopático, nefropatía de cambio mínimo, lesión de reperfusión isquémica y familiar benigna, autoinmunidad retiniana, inflamación de las articulaciones, bronquitis, enfermedad de las vías respiratorias obstructiva crónica, silicosis, aftas, estomatitis aftosa, trastornos

arterioescleróticos, espermiogénesis, hemólisis autoinmunitaria, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmia facoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nudoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman–Rich, pérdida de la audición sensoneural, hemoglobinuria paroxismática, hipogonadismo, ileítis regional, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversal, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmia simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, polirradiculitis aguda, piodermia gangrenosa, tiroiditis de Quervain, atrofia esplénica adquirida, infertilidad debido a anticuerpos antiespermatozoarios, timoma no maligno, vitiligo, SCID (síndrome en inglés de "inmunodeficiencia combinada severa") y enfermedades asociadas con el virus de Epstein–Barr, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), enfermedades parasitarias tales como leishmaniosis, síndrome de choque tóxico, envenenamiento por alimentos, afecciones que involucran la infiltración de células T, deficiencia de adhesión leucocitaria, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y demorada mediada por citoquinas y linfocitos T, enfermedades que involucran diapedesis leucocitaria, síndrome de lesión de órganos múltiples, enfermedades mediadas por el complejo de antígeno–anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, neuritis alérgica, poliendocrinopatías autoinmunitarias, ovaritis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmunitaria, oftalmia simpática, enfermedades reumáticas, enfermedad del tejido conectivo mixta, síndrome nefrótico, insulitis, insuficiencia poliendocrina, neuropatía periférica, síndrome poliglandular autoinmunitario tipo I, hipoparatiroidismo idiopático de inicio en el adulto (AOIH, por sus siglas en inglés), alopecia total, miocardiopatía dilatada, epidermólisis ampollosa adquirida (EBA, por sus siglas en inglés), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrótico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis etmoide, frontal, maxilar o esenoide, un trastorno relacionado con los eosinófilos, tal como eosinofilia, eosinofilia de infiltración pulmonar, síndrome de eosinofilia–mialgia, síndrome de Löffler, neumonía eosinofílica crónica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilosis bronconeumónica, aspergiloma, o granulomas que contienen

eosinófilos, anafilaxia, espondiloartritis seronegativas, enfermedad autoinmunitaria poliendocrina, colangitis esclerosante, esclerótica, epiesclerótica, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott–Aldrich, ataxia telangiectasia, trastornos autoinmunitarios asociados con la enfermedad del colágeno, reumatismo, enfermedad neurológica, trastorno de reperfusión isquémica, reducción en la respuesta de la tensión arterial, disfunción vascular, aneurisma, lesión de tejido, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia cerebral y enfermedad que acompaña la vascularización, trastornos de hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesión de reperfusión, lesión de reperfusión de tejido miocárdico u otros tejidos, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, meningitis purulenta aguda, u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, síndromes asociados con transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citoquinas, inflamación grave aguda, inflamación resistente al tratamiento crónica, pielitis, neumonocirrosis, retinopatía diabética, trastorno diabético de las arterias de grueso calibre, hiperplasia endoarterial, úlcera péptica, valvulitis y endometriosis.

El término “detección” tiene el propósito de incluir la determinación de la presencia o ausencia de un agente, o la cuantificación de la cantidad de un agente. En consecuencia, el término se refiere al uso de los materiales, las composiciones y los métodos de la presente invención para determinaciones cualitativas y cuantitativas. En general, la técnica particular utilizada para la detección no es decisiva para la práctica de la invención.

Por ejemplo, la “detección”, de acuerdo con la invención, puede incluir: la observación de la presencia o ausencia de producto génico $\alpha 5$, un producto génico $\beta 1$ (por ejemplo, moléculas de ARNm), o un polipéptido $\alpha 5$ o $\alpha 5\beta 1$; un cambio en los niveles de un polipéptido $\alpha 5$ o $\alpha 5\beta 1$ o de la cantidad ligada a un blanco; un cambio en la función/actividad biológica de un polipéptido $\alpha 5$ o $\alpha 5\beta 1$. En algunas realizaciones, la “detección” puede incluir la detección de los niveles de $\alpha 5$ o $\alpha 5\beta 1$ de tipo silvestre (por ejemplo, los niveles de polipéptidos o ARNm). La detección puede comprender la cuantificación de un cambio (por ejemplo, un

incremento o una disminución) de cualquier valor de por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, o más, en comparación con un control. La detección puede incluir la cuantificación de un cambio de cualquier valor de por lo menos aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, o más, por ejemplo, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o más.

El término "marca", empleado en la presente solicitud, se refiere a una composición o un compuesto detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo. La marca puede ser, en sí misma, detectable (por ejemplo, marcas de radioisótopos o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto sustrato o una composición que es detectable.

III. Anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$.

Se proveen en esta solicitud anticuerpos que pueden unirse a $\alpha 5\beta 1$ humana e inhibir en forma competitiva la unión del anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ 18C12 a $\alpha 5\beta 1$ humana. Por lo tanto, una realización de la invención provee anticuerpos que comprenden una secuencia liviana variable (VL) expuesta en cualquiera de SEC. ID. NROS.: 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, y una secuencia pesada variable (VH) expuesta en cualquiera de SEC. ID. NROS.: 9, 10, 11, 12, 13 ó 14. Se contemplan además las formas humanas o quiméricas (que incluyen, por ejemplo, humanizadas) de los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ que se describen en esta solicitud.

De acuerdo con una realización, el anticuerpo se une a $\alpha 5\beta 1$ humana con un valor K_d entre 500 nM y 1 pM. En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en esta solicitud tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu M$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M ; por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). De acuerdo con otra realización, el anticuerpo no se une a $\alpha V\beta 3$ o $\alpha V\beta 5$ o $\alpha V\beta 1$. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo comprende una secuencia Fc de una IgG humana, por ejemplo, IgG1 humana o IgG4 humana. En otra realización, una secuencia Fc se ha alterado o cambiado de otro modo de modo que carece de la función efectora de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), a menudo, relacionada con su unión a receptores Fc (FcR). Hay muchos ejemplos de cambios o mutaciones en secuencias Fc que pueden alterar la función efectora. Por ejemplo, el documento WO 00/42072 y la referencia de Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9 (2): 6591–6604 (2001) describen variantes de anticuerpos con mayor o menor unión a FcR. Los contenidos de dichas publicaciones se incorporan específicamente en esta solicitud, a modo de referencia. El anticuerpo puede presentarse en forma de un fragmento Fab, Fab', F(ab)'₂, Fv de cadena simple (scFv), un fragmento Fv; un diacuerpo, y un anticuerpo lineal. Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo multiespecífico que se une a $\alpha 5\beta 1$ y es un antagonista de $\alpha 5\beta 1$, si bien se une además a uno o más blancos e inhibe su función (por ejemplo, VEGF), o puede ser un anticuerpo multiespecífico que se une a dos o más sitios diferentes en $\alpha 5\beta 1$. El anticuerpo puede conjugarse a un

agente terapéutico (por ejemplo, un agente citotóxico, un radioisótopo y un agente quimioterapéutico) o una marca para la detección de $\alpha 5\beta 1$ en muestras de pacientes, o *in vivo*, por medio de imágenes (por ejemplo, radioisótopo, colorante fluorescente y enzima).

Se contemplan además, las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$, vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican uno o ambos dominios variables, y células que comprenden las moléculas de ácido nucleico. Estos anticuerpos pueden usarse en las terapias que se describen en esta solicitud, a fin de detectar proteína $\alpha 5\beta 1$ en muestras de pacientes (por ejemplo, usando FACS, inmunohistoquímica (IHC), ensayos ELISA) o en pacientes.

A. Anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse, por ejemplo, usando métodos de hibridoma, tales como aquellos descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975), pueden prepararse por medio de métodos de ADN recombinado (Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567), o pueden producirse por los métodos que se describen en esta solicitud, en los Ejemplos que siguen. En un método de hibridoma, un hámster, ratón u otro animal huésped apropiado se inmuniza típicamente con un agente de inmunización (por ejemplo, un polipéptido $\alpha 5$, $\beta 1$, o $\alpha 5\beta 1$ solo o en combinación con un portador adecuado), a fin de producir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán de manera específica al agente de inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

El agente de inmunización típicamente incluirá un polipéptido o una proteína de fusión de la proteína de interés, o una composición que comprende la proteína. En general, se usan o bien linfocitos de sangre periférica ("PBL", por sus siglas en inglés), si se desean células de origen humano, o se usan células del bazo o células de los nodos linfáticos, si se desean fuentes mamíferas no humanas. Los linfocitos entonces se fusionan con una estirpe celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, a fin de formar una célula de hibridoma. Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (New York:

Academic Press, 1986), pp. 59–103. Las estirpes celulares inmortalizadas habitualmente son células de mamíferos transformadas, en particular, células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se emplean estirpes celulares de mieloma de ratón o rata. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que, preferentemente, contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células no fusionadas, inmortalizadas. Por ejemplo, si las células progenitoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), donde dichas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las estirpes celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan en forma eficaz, sostienen la expresión estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles al medio, tal como medio HAT. Las estirpes celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murinas, que pueden obtenerse, por ejemplo, en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection (Colección de Cultivos de Tipo Norteamericano), Manassas, Virginia. Las estirpes celulares de heteromieloma de ratón y humano y de mieloma 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 (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51–63.

El medio de cultivo en el cual se cultivan las células de hibridoma entonces puede ensayarse a fin de determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido. La especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma puede determinarse por medio de la inmunoprecipitación o por medio de un ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en el arte. La afinidad de unión

del anticuerpo monoclonal, por ejemplo, puede determinarse por medio del análisis Scatchard de Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse por medio de procedimientos de dilución de limitación, y pueden cultivarse por métodos convencionales. Goding, *supra*. El medio de cultivo adecuado para este propósito incluye, por ejemplo, medio de Eagle modificado de Dulbecco y RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis, en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden ser aislados o purificados del medio de cultivo o el fluido ascítico por medio de procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales además pueden prepararse por medio de métodos de ADN recombinado, tales como aquellos descritos en la Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567. El ADN codificador de los anticuerpos monoclonales de la invención puede ser aislado sin dificultad y secuenciado usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse en forma específica a genes que codifican las cadenas pesada y liviana de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede ser colocado en vectores de expresión, que luego son transfectados en células huéspedes tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, a fin de obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huéspedes recombinadas. El ADN además puede ser modificado, por ejemplo, mediante la sustitución con la secuencia codificadora para los dominios constantes humanos de cadena pesada y liviana, en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567; Morrison *et al.*, *supra*), o mediante la unión covalente a la secuencia codificadora de inmunoglobulina, de la totalidad o parte de la secuencia

codificadora para un polipéptido no inmunoglobulina. Con dicho polipéptido no inmunoglobulina pueden sustituirse los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o pueden sustituirse los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención, de manera de crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para la preparación de anticuerpos monovalentes son conocidos en el arte. Por ejemplo, un método involucra la expresión recombinada de cadena liviana de inmunoglobulina y cadena pesada modificada. La cadena pesada es truncada generalmente en cualquier punto en la región Fc de modo de evitar el entrecruzamiento de cadena pesada. Alternativamente, los residuos cisteína pertinentes son sustituidos con otro residuo de aminoácido, o son deletados de manera de evitar el entrecruzamiento.

Los métodos *in vitro* también se usan para la preparación de anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para la producción de sus fragmentos, en particular, fragmentos Fab, puede efectuarse usando, sin limitación, técnicas conocidas en el arte.

B. Anticuerpos humanos.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en esta solicitud es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en el arte. Los anticuerpos humanos se describen generalmente en la referencia de van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368–74 (2001), y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.*, 20: 450–459 (2008).

Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la estimulación antigénica. Dichos animales típicamente contienen la totalidad o una porción de los *loci* (lugares) de inmunoglobulina humana, que reemplazan los *loci* de inmunoglobulina endógena, o que se presentan en forma extracromosómica o integrada aleatoriamente en los

cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los *loci* de inmunoglobulina endógena han sido generalmente inactivados. Para una reseña de los métodos para la obtención de anticuerpos humanos de animales transgénicos, ver la referencia de Lonberg, *Nat. Biotech.*, 23: 1117–1125 (2005). Ver, además, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nros. 6.075.181 y 6.150.584, que describen la tecnología XENOMOUSETM; Patente de los Estados Unidos Nro. 5.770.429, que describe la tecnología HUMAB®; Patente de los Estados Unidos Nro. 7.041.870, que describe la tecnología K–M MOUSE®; y Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nro. 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante la combinación con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos pueden prepararse además por medio de métodos sobre la base de hibridoma. Se han descrito estirpes celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón y humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Ver, por ejemplo, Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51–63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)). Los anticuerpos humanos generados por medio de la tecnología de hibridoma de células B humanas se describen también en la referencia de Li *et al.*, *PNAS. USA*, 103: 3557–3562 (2006). Los métodos adicionales incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nro. 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales de estirpes celulares de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26 (4): 265–268 (2006) (que describe hibridomas de humano–humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en la referencia de 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).



Los anticuerpos humanos pueden ser generados también por medio del aislamiento de secuencias de dominio variable de clon Fv seleccionadas de genotecas de exhibición de fagos derivadas de humanos. Dichas secuencias de dominio variable entonces pueden combinarse con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para la selección de anticuerpos humanos de genotecas de anticuerpos se describen a continuación.

C. Anticuerpos derivados de genotecas.

Los anticuerpos de la invención pueden aislarse por medio de la identificación sistemática de genotecas de combinación a fin de establecer anticuerpos con la actividad o las actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen en el arte una diversidad de métodos para la generación de genotecas de exhibición de fagos y la identificación sistemática de dichas genotecas a fin de establecer anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos métodos son reseñados, por ejemplo, en la referencia de Hoogenboom *et al.*, en *Methods in Molecular Biology*, 178: 1–37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y son descriptos adicionalmente, por ejemplo, en la referencia de McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552–554; Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624–628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581–597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology*, 248: 161–175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338 (2): 299–310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340 (5): 1073–1093 (2004); Fellouse, *PNAS USA*, 101 (34): 12467–12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 284 (1–2): 119–132 (2004).

En ciertos métodos de exhibición de fagos, se clonan en forma separada repertorios de genes VH y VL por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se recombinan en forma aleatoria en genotecas de fagos, que luego pueden someterse a la identificación sistemática a fin de establecer fago de unión de antígeno, como se describe en la referencia de Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433–455 (1994). Los fagos habitualmente exhiben fragmentos de anticuerpos, o bien como fragmentos Fv de cadena simple (scFv) o como fragmentos Fab. Las genotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno, sin la necesidad de construcción de hibridomas.

Alternativamente el repertorio original puede clonarse (por ejemplo, de humano) a fin de proporcionar una sola fuente de anticuerpos a un amplio rango de no autoantígenos, y también, autoantígenos, sin ninguna inmunización, como lo describen Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725–734 (1993). Finalmente, las genotecas originales también pueden prepararse en forma sintética, mediante la clonación de segmentos de genes V no redispuestos de células madre, y el uso de cebadores de PCR que contienen secuencia aleatoria, a fin de codificar las regiones CDR3 altamente variables y lograr la redistribución *in vitro*, como lo describen Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381–388 (1992). Las publicaciones de patente que describen genotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: Patente de los Estados Unidos Nro. 5.750.373 y Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nros. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de genotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos, en esta solicitud.

D. Anticuerpos quiméricos y humanizados.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en esta solicitud es un anticuerpo quimérico. Ciertos anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nro. 4.816.567; y en la referencia de Morrison *et al.*, *PNAS USA*, 81: 6851–6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de ratón, rata, hámster, conejo, o primate no humano, tal como mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo “con cambio de clase”, en el cual la clase o subclase ha sido cambiada de aquella del anticuerpo progenitor. Los anticuerpos quiméricos incluyen sus fragmentos de unión de antígeno.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Habitualmente, un anticuerpo no humano es humanizado a fin de reducir la inmunogenicidad en humanos, y a la vez, retener la especificidad y la

afinidad del anticuerpo no humano progenitor. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables donde las HVR, por ejemplo, CDR (o sus porciones), derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o sus porciones) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá por lo menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos residuos FR en un anticuerpo humanizado están sustituidos con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del cual derivan los residuos HVR), por ejemplo, a fin de restaurar o mejorar la afinidad o especificidad de anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para su preparación son reseñados, por ejemplo, en la referencia de Almagro y Fransson, *Front. Biosci.*, 13: 1619–1633 (2008), y son adicionalmente descritos, por ejemplo, en las referencias de Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323–329 (1988); Queen *et al.*, *PNAS USA*, 86: 10029–10033 (1989); Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.821.337; 7.527.791; 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri *et al.*, *Methods*, 36: 25–34 (2005) (que describen el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28: 489–498 (1991) (que describe la “resuperficie”); Dall’Acqua *et al.*, *Methods*, 36: 43–60 (2005) (que describe la “mezcla de FR”); y Osbourn *et al.*, *Methods*, 36: 61–68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83: 252–260 (2000) (que describe el enfoque de “selección guiada” para la mezcla de FR).

Las regiones de marco humanas que pueden usarse para la humanización incluyen, sin limitación: regiones de marco seleccionadas usando el método de “mejor ajuste” (ver, por ejemplo, la referencia de Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993)); regiones de marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena liviana o pesada (ver, por ejemplo, las referencias de Carter *et al.*, *PNAS USA*, 89: 4285 (1992); y Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)); regiones de marco maduras humanas (somáticamente mutadas) o regiones de marco de línea germinal humanas (ver, por ejemplo, la referencia de Almagro y Fransson, *Front. Biosci.*, 13: 1619–1633 (2008)); y regiones de marco derivadas de la identificación

sistemática de genotecas FR (ver, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272: 10678–10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271: 22611–22618 (1996)).

E. Anticuerpos multiespecíficos.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en esta solicitud es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es para $\alpha 5\beta 1$, y la otra es para cualquier otro antígeno (por ejemplo, VEGF). En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de $\alpha 5\beta 1$. Los anticuerpos biespecíficos además pueden usarse a fin de localizar agentes citotóxicos en células que expresan $\alpha 5\beta 1$. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud total o como fragmentos de anticuerpos.

Las técnicas para la preparación de anticuerpos multiespecíficos comprenden, sin limitación, la coexpresión de dos pares de cadena pesada–cadena liviana de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (ver las referencias de Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)), WO 93/08829 y Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991)), y el diseño de “nudo en orificio” (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también pueden prepararse mediante el diseño de efectos de conducción electrostática para la preparación de moléculas heterodímeros de Fc de anticuerpo (WO 2009/089004A1); el entrecruzamiento de dos o más anticuerpos o fragmentos (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 4.676.980, y referencia de Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)); el uso de cierres de leucina (tramos de aminoácidos de 4 a 7 residuos de leucina, cada uno, separado por 6 aminoácidos, adyacentes a un tramo de aminoácidos altamente básicos, en algunas proteínas de unión de ADN) para producir anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, las referencias de Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148 (5): 1547–1553 (1992)); el uso de tecnología de “diacuerpos” para la preparación de fragmentos de anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, la referencia de Hollinger *et al.*, *PNAS USA*, 90: 6444–6448 (1993)); y el uso de dímeros de Fv de

cadena simple (sFv) (ver, por ejemplo, la referencia de Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)); y la preparación de anticuerpos triespecíficos como se describe, por ejemplo, en la referencia de Tutt *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 60 (1991).

Los anticuerpos diseñados con tres o más sitios de unión de antígeno funcionales, que incluyen "anticuerpos pulpo", se incluyen también en la presente solicitud (ver, por ejemplo, US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento de la presente solicitud además comprende un "Fab de Acción Dual" o "DAF", que comprende un sitio de unión de antígeno que se une a $\alpha 5\beta 1$ al igual que otro antígeno diferente (ver, por ejemplo, US 2008/0069820).

F. Variantes de anticuerpos.

En ciertas realizaciones, se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos provistos en esta solicitud. Por ejemplo, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o por medio de la síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones, inserciones y sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede efectuarse cualquier combinación de delección, inserción y sustitución, a fin de lograr la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión de antígeno.

1. Variantes de sustitución, inserción y delección.

En ciertas realizaciones, se proveen variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1, con el encabezado "sustituciones conservadoras". Se proveen cambios más sustanciales en la Tabla 1, con el encabezado "sustituciones ejemplares", y como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en un anticuerpo de interés, y los productos pueden someterse a la identificación sistemática a fin de detectar una actividad deseada, por ejemplo, unión de antígeno retenida o mejorada, menor inmunogenicidad, o mejor ADCC o CDC.

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones ejemplares	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
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con las propiedades de cadenas laterales comunes:

- (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) neutros hidrófilos: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que afectan la orientación de cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras acarrearán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución supone la sustitución de uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo progenitor (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). En general, las variantes resultantes seleccionadas para el posterior estudio tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoramientos) en ciertas propiedades biológicas (por ejemplo, mayor afinidad, menor inmunogenicidad), en relación con el anticuerpo progenitor, o habrán retenido sustancialmente ciertas propiedades biológicas del anticuerpo progenitor. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo madurado para afinidad, que puede ser generado, convenientemente, usando técnicas de maduración para afinidad sobre la base de la exhibición de fagos, tales como aquellas que se describen en esta solicitud. Brevemente, uno o más residuos HVR son mutados, y los anticuerpos variantes son exhibidos en fagos y sometidos a la identificación sistemática a fin de detectar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

Pueden efectuarse alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en HVR, por ejemplo, a fin de mejorar la afinidad de anticuerpo. Dichas alteraciones pueden realizarse en "sitios calientes" de HVR, es decir, en residuos codificados por codones que sufren la mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (ver, por ejemplo, la referencia de Chowdhury, *Methods Mol. Biol.*, 207: 179–196 (2008)), y/o SDR (a-CDR), donde la variante resultante VH o VL es ensayada para establecer la afinidad de unión. La maduración para afinidad mediante la construcción y reelección a partir de genotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en la referencia de Hoogenboom *et al.*, en *Methods in Molecular Biology*, 178: 1–37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) En algunas realizaciones de maduración para afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para maduración mediante cualquiera de una diversidad de métodos (por ejemplo, la PCR propensa al error, la mezcla de cadenas o la mutagénesis dirigida por oligonucleótido). Entonces se crea una genoteca secundaria. Luego la genoteca se somete a la identificación sistemática a fin de identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para la introducción de diversidad involucra enfoques

dirigidos a HVR, donde se aleatorizan varios residuos HVR (por ejemplo, 4–6 residuos de una vez). Los residuos HVR involucrados en la unión de antígeno pueden ser identificados específicamente, por ejemplo, usando mutagénesis de barrido de alanina o modelado. A menudo, se apuntan CDR–H3 y CDR–L3 en particular.

En ciertas realizaciones, pueden producirse sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan de manera sustancial la capacidad del anticuerpo para unirse a antígeno. Por ejemplo, pueden efectuarse en HVR alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proveen en esta solicitud) que no reduzcan de manera sustancial la afinidad de unión. Dichas alteraciones pueden encontrarse fuera de los "sitios calientes" de HVR o SDR. En ciertas realizaciones de las secuencias variantes de VH y VL que se proveen anteriormente, cada HVR o bien no es alterado, o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que puede ser apuntado para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina", como lo describen Cunningham y Wells (1989), *Science*, 244: 1081–1085. En este método, se identifican un residuo o grupo de residuos blanco (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu), y son reemplazados por un aminoácido neutro o negativamente cargado (por ejemplo, alanina o polialanina), a fin de determinar si la interacción del anticuerpo con antígeno es afectada. Pueden introducirse otras sustituciones en las regiones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales; alternativa o adicionalmente, una estructura de cristal de un complejo de antígeno–anticuerpo para la identificación de puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos pueden ser apuntados o eliminados como candidatos para la sustitución. Las variantes pueden someterse a la identificación sistemática, a fin de determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo–terminales que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, al igual que inserciones de intrasecuencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N–terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al término N o C del anticuerpo, de una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida sérica del anticuerpo.

2. Variantes de glicosilación.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo provisto en esta solicitud es alterado a fin de incrementar o disminuir el alcance al cual el anticuerpo es glicosilado. La adición o delección de sitios de glicosilación a un anticuerpo puede lograrse de modo conveniente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera de crear o eliminar uno o más sitios de glicosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a esta. Los anticuerpos nativos producidos por células mamíferas típicamente comprenden un oligosacárido ramificado, biantenarico, que generalmente está unido por una conexión N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, por ejemplo, la referencia de Wright *et al.*, *TIBTECH*, 15: 26–32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N–acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, al igual que una fucosa unida a un GlcNAc en el “tallo” de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención pueden efectuarse a fin de crear variantes de anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas.

En una realización, se proveen variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de 1% a 80%, de 1% a 65%, de 5% a 65% o de 20% a 40%. La cantidad de fucosa se determina mediante el cálculo de la cantidad promedio de fucosa dentro

de la cadena de azúcar en Asn297, en relación con la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, complejo, híbrido y estructuras de alta manosa), medido por espectrometría de masa MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo asparagina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de residuos de región Fc); sin embargo, Asn297 también puede ubicarse aproximadamente ± 3 aminoácidos corriente ascendente o descendente de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones menores de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener mejor función ADCC. Ver, por ejemplo, Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nros. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos “defucosiladas” o “con deficiencia de fucosa” 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; WO 2005/053742; WO 2002/031140; 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 células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteína (Ripka *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 249: 533–545 (1986); Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nro. US 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, en especial, en el Ejemplo 11), y estirpes celulares de noqueo (*knockout*: inactivación de genes específicos como modelo de enfermedad; una mutante individual donde se ha reemplazado un solo gen funcional por una forma no funcional del gen), tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO de noqueo (ver, por ejemplo, la referencia de Yamane–Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.*, 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al., Biotechnol. Bioeng.*, 94 (4): 680–688 (2006); y WO 2003/085107).

Se proporcionan asimismo variantes de anticuerpos con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en los cuales un oligosacárido biantenarío unido a la

región Fc del anticuerpo es biseccionado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener reducida fucosilación y/o mejor función ADCC. Ejemplos de dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); Patente de los Estados Unidos Nro. 6.602.684 (Umana *et al.*); y US 2005/0123546 (Umana *et al.*). Se proporcionan además variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener mejor función CDC. Dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

3. Variantes de región Fc.

En ciertas realizaciones, una o más modificaciones de aminoácidos pueden introducirse en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en esta solicitud, a fin de generar así una variante de región Fc, de manera de mejorar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de una enfermedad o de un trastorno que involucra la anormal angiogénesis, pérdida o permeabilidad vascular. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc humana IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas las funciones efectoras, lo que la convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las cuales la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, si bien ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o nocivas. Pueden conducirse ensayos de citotoxicidad *in vitro* o *in vivo* a fin de confirmar la reducción o el agotamiento de las actividades CDC o ADCC. Por ejemplo, pueden conducirse ensayos de unión de receptor Fc (FcR) de manera de garantizar que el anticuerpo carece de unión FcγR (y en consecuencia, probablemente carezca de actividad ADCC), si bien retiene la capacidad de unión FcRn. Las células primarias para la mediación de ADCC, las células NK, expresan Fc(RIII solo, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la

Tabla 3 de la página 464 de la referencia de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457–92 (1991). Ejemplos no limitativos de ensayos *in vitro* para la evaluación de la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.500.362 (ver, por ejemplo, las referencias de Hellstrom, I., *et al.*, *PNAS USA*, 83: 7059–7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al.*, *PNAS USA*, 82: 1499–1502 (1985); y 5.821.337 (ver la referencia de Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 166: 1351–1361 (1987)). Alternativamente, pueden emplearse métodos de ensayo no radiactivos (ver, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactiva ACTI™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radiactiva CYTOTOX 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De manera alternativa o adicional, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como aquel descrito en la referencia de Clynes *et al.*, *PNAS USA*, 95: 652–656 (1998). Los ensayos de unión C1q también pueden efectuarse a fin de confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q, y en consecuencia, carece de actividad CDC. Ver, por ejemplo, ELISA de unión C1q y C3c en el documento WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Con la finalidad de evaluar la activación de complemento, puede efectuarse un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, las referencias de Gazzano–Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 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)). La unión de FcRn y las determinaciones de aclaramiento/semivida *in vivo* también pueden efectuarse usando métodos conocidos en el arte (ver, por ejemplo, la referencia de Petkova, S. B. *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18 (12): 1759–1769 (2006)).

Los anticuerpos con menor función efectora incluyen aquellos con sustitución de uno o más residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente de los Estados Unidos Nro. 6.737.056). Dichas mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, que incluyen la así denominada mutante de Fc “DANA”

con sustitución de los residuos 265 y 297 a alanina (Patente de los Estados Unidos Nro. 7.332.581).

Se encuentran descriptas ciertas variantes de anticuerpos con mayor o menor unión a FcR (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 6.737.056; WO 2004/056312, y Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9 (2): 6591–6604 (2001)).

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración de residuos EU).

En algunas realizaciones, se hacen alteraciones en la región Fc que logran la alterada (es decir, mayor o menor) unión de C1q y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nro. 6.194.551, WO 99/51642, y en la referencia de Idusogie *et al.* *J. Immunol.*, 164: 4178–4184 (2000).

Pueden efectuarse mutaciones o alteraciones en las secuencias de región Fc a fin de aumentar la unión de FcR (por ejemplo, FcγR, FcRn). De acuerdo con una realización, un anticuerpo de esta invención tiene por lo menos una función efectora alterada seleccionada del grupo que consiste en ADCC, CDC y mayor unión de FcRn, en comparación con una IgG nativa o un anticuerpo progenitor. Ejemplos de varias mutaciones específicas útiles se describen, por ejemplo, en las referencias de Shields, R. L. *et al.* (2001), *JBC*, 276 (6) 6591–6604; Presta, L. G. (2002), *Biochemical Society Transactions*, 30 (4): 487–490; y WO 00/42072. Los anticuerpos con mayores semividas y mayor unión al receptor Fc neonato (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternos al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.*, 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.*, 24: 249 (1994)), se describen en US 2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Dichos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones, que aumentan la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 ó 434, por

ejemplo, la sustitución del residuo 434 de la región Fc (Patente de los Estados Unidos Nro. 7.371.826).

Ver, además, la referencia de Duncan & Winter, *Nature*, 322: 738–40 (1988); Patente de los Estados Unidos Nro. 5.648.260; Patente de los Estados Unidos Nro. 5.624.821; y WO 94/29351, que se refieren a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

4. Variantes de anticuerpos diseñadas con cisteína.

En ciertas realizaciones, puede ser conveniente crear anticuerpos diseñados con cisteína, por ejemplo, "thioMAbs," en los cuales uno o más residuos de un anticuerpo están sustituidos con residuos cisteína. En realizaciones particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la sustitución de dichos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se posicionan de ese modo en sitios accesibles del anticuerpo, y pueden usarse para la conjugación del anticuerpo con otras porciones, tales como porciones de fármaco o porciones de conector-fármaco, de modo de crear un inmunoconjugado, tal como se describe en mayor detalle en la presente solicitud. En ciertas realizaciones, puede sustituirse cualesquiera uno o más de los siguientes residuos, con cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena liviana; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de cadena pesada. Los anticuerpos diseñados con cisteína pueden generarse como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nro. 7.521.541.

En algunas realizaciones, los residuos cisteína pueden introducirse en la región Fc, de manera de permitir la formación de enlace de disulfuro de intercadena en esta región. El anticuerpo homodímero generado de este modo puede tener mayor capacidad de internalización, o mayores capacidad de muerte celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Ver las referencias de Caron *et al.*, *J. Exp. Med.*, 176: 1191–1195 (1992), y Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918–2922 (1992). Los anticuerpos homodímeros con mayor actividad antitumoral también pueden prepararse usando

entrecruzadores heterobifuncionales, como se describe en la referencia de Wolff *et al.*, *Cancer Research*, 53: 2560–2565 (1993). Alternativamente, puede diseñarse un anticuerpo que tenga regiones Fc duales, y en consecuencia, pueda poseer mayores lisis de complemento y capacidades ADCC. Ver la referencia de Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219–230 (1989).

5. Derivados de anticuerpos.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente solicitud puede modificarse adicionalmente de manera de contener porciones no proteináceas adicionales conocidas en el arte y de fácil disponibilidad. Las porciones adecuadas para la derivación del anticuerpo incluyen, sin limitación, polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitativos de los polímeros solubles en agua incluyen, sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (o bien homopolímeros o copolímeros de azar) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y sus mezclas. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas en la elaboración, debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se unen más de un polímero, estos pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, la cantidad o el tipo de polímeros utilizados para la derivación puede determinarse sobre la base de consideraciones que incluyen, sin limitación, las propiedades particulares o las funciones del anticuerpo por mejorar, el uso del derivado de anticuerpo en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proveen conjugados de un anticuerpo y una porción no proteinácea que pueden calentarse selectivamente mediante la exposición a la radiación. En una realización, la porción no proteinácea es un nanotubo de carbón

(Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 11600–11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, sin limitación, longitudes de onda que no dañan células comunes, si bien calientan la porción no proteinácea hasta una temperatura a la cual las células próximas a la porción no proteinácea-anticuerpo mueren.

F. Inmunoconjugados.

La invención además provee inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ de la presente invención, conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como fármacos o agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas de proteína, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de planta, o animal, o sus fragmentos), o isótopos radiactivos.

En una realización, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) en el cual se conjuga un anticuerpo con uno o más fármacos, que incluyen, sin limitación, un maitansinoide (ver Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.208.020; 5.416.064 y Patente Europea EP 0 425 235 B1); una auristatina, tal como porciones de fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (ver Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.635.483; 5.780.588 y 7.498.298); una dolastatina; una caliqueamicina o su derivado (ver Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.712.374; 5.714.586; 5.739.116; 5.767.285; 5.770.701; 5.770.710; 5.773.001; y 5.877.296; Hinman *et al.*, *Cancer Res.*, 53: 3336–3342 (1993); y Lode *et al.*, *Cancer Res.*, 58: 2925–2928 (1998)); una antraciclina, tal como daunomicina o doxorubicina (ver las referencias de Kratz *et al.*, *Current Med. Chem.*, 13: 477–523 (2006); Jeffrey *et al.*, *Bioorganic & Med. Chem. Letters*, 16: 358–362 (2006); Torgov *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 16: 717–721 (2005); Nagy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 829–834 (2000); Dubowchik *et al.*, *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, 12: 1529–1532 (2002); King *et al.*, *J. Med. Chem.*, 45: 4336–4343 (2002); y Patente de los Estados Unidos Nro. 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otra realización, un inmunoc conjugado comprende un anticuerpo como se describe en la presente solicitud conjugado con una toxina enzimáticamente activa o su fragmento, que incluye, sin limitación, toxina de difteria cadena A, fragmentos activos no ligantes de toxina de difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otra realización, un inmunoc conjugado comprende un anticuerpo como se describe en esta solicitud conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Pueden obtenerse una diversidad de isótopos radiactivos para la producción de radioconjugados. Ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios centellográficos, por ejemplo, tc99m o I^{123} , o una marca espín, para la imagen de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen de resonancia magnética, IRM), tal como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro. Los conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluor-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en la referencia de Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido

1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Ver WO 94/11026. El conector puede ser un "conector dissociable" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un conector lábil al ácido, conector sensible a la peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Res.*, 52: 127-131 (1992); Patente de los Estados Unidos Nro. 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC de la presente invención contemplan expresamente, sin limitación, conjugados preparados con reactivos de entrecruzadores que incluyen, sin limitación, 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 pueden obtenerse en el mercado (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U. S. A).

G. Inmunoliposomas.

Los anticuerpos revelados en la presente solicitud además pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en el arte, tales como los descritos en la referencia de Epstein *et al.*, *PNAS USA*, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *PNAS USA*, 77: 4030 (1980); y Patente de los Estados Unidos Nros. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con mayor tiempo de circulación se revelan en la Patente de los Estados Unidos Nro. 5.013.556.

Los liposomas particularmente útiles pueden generarse por medio del método de evaporación de fase inversa, con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas son extruidos a través de filtros de tamaño de poro definido, a fin de lograr liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse con los liposomas como se describe en la referencia de Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) por medio de una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente, un

liposoma contiene un agente antineoplásico, un agente inhibidor del crecimiento, o un agente quimioterapéutico (tal como doxorubicina). Ver la referencia de Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.*, 81 (19): 1484 (1989).

IV. Métodos terapéuticos usando anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$.

Cualquiera de los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ provistos en esta solicitud puede usarse en métodos terapéuticos. Se entiende que cualquiera de las formulaciones o de los métodos terapéuticos que se describen en esta solicitud puede usarse con un inmunoconjugado de la invención, en lugar de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$, o además de dicho anticuerpo.

En un aspecto, se provee un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ para el uso como un medicamento. En otros aspectos, se provee un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ para el uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos que involucran la anormal angiogénesis o pérdida o permeabilidad vascular, que incluyen, por ejemplo, cáncer, enfermedades oculares y trastornos inmunitarios (por ejemplo, trastornos autoinmunitarios). En ciertas realizaciones, se provee un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ para el uso en un método de tratamiento. En ciertas realizaciones, la invención provee un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ para el uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o un trastorno que involucra la anormal angiogénesis o pérdida o permeabilidad vascular, que comprende la administración al individuo, de una cantidad eficaz del anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$. En una de dichas realizaciones, el método además comprende la administración al individuo, de una cantidad eficaz de por lo menos uno, dos, tres, cuatro o más agentes terapéuticos adicionales, que incluyen, por ejemplo, un agente antiangiogénico, un agente antineoplásico, un agente inhibidor del crecimiento, o un agente quimioterapéutico, tal como se describe en esta solicitud. En realizaciones adicionales, la invención provee un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ para el uso en la inhibición de la anormal angiogénesis y pérdida o permeabilidad vascular. En ciertas realizaciones, la invención provee un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ para el uso en un método de inhibición de la anormal angiogénesis y pérdida o permeabilidad vascular en un individuo, que comprende la administración al individuo, de una

cantidad eficaz del anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ de manera de inhibir la anormal angiogénesis y pérdida o permeabilidad vascular. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, es, preferentemente, un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención provee el uso de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ en la elaboración o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad o de un trastorno que involucra la anormal angiogénesis y/o pérdida o permeabilidad vascular. En una realización adicional, el medicamento es para el uso en un método de tratamiento de una enfermedad o de un trastorno que involucra la anormal angiogénesis y/o pérdida o permeabilidad vascular, que comprende la administración a un individuo que tiene una enfermedad o un trastorno que involucra la anormal angiogénesis y/o pérdida o permeabilidad vascular, de una cantidad eficaz del medicamento. En una de dichas realizaciones, el método además comprende la administración al individuo, de una cantidad eficaz de por lo menos uno, dos, tres, cuatro o más agentes terapéuticos adicionales que incluyen, por ejemplo, un agente antiangiogénico, un agente antineoplásico, un agente inhibidor del crecimiento, o un agente quimioterapéutico, como se describe en esta solicitud. En una realización adicional, el medicamento es para la inhibición de la anormal angiogénesis y/o pérdida o permeabilidad vascular. En una realización adicional, el medicamento es para el uso en un método de inhibición de la anormal angiogénesis y/o pérdida o permeabilidad vascular en un individuo, que comprende la administración al individuo, de una cantidad eficaz del medicamento a fin de inhibir la anormal angiogénesis y/o pérdida o permeabilidad vascular. Un "individuo", de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención provee un método para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno que involucra la anormal angiogénesis y/o pérdida o permeabilidad vascular. En una realización, el método comprende la administración a un individuo que tiene dicha enfermedad o dicho trastorno que involucra la anormal angiogénesis y/o pérdida o permeabilidad vascular, de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$. En una de dichas realizaciones, el

método además comprende la administración, al individuo, de una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional, como se describe a continuación. Un "individuo", de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, puede ser un humano.

En un aspecto adicional, la invención provee un método para la inhibición de la anormal angiogénesis y/o pérdida o permeabilidad vascular en un individuo. En una realización, el método comprende la administración al individuo, de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ a fin de inhibir la anormal angiogénesis y/o pérdida o permeabilidad vascular. En una realización, un "individuo" es un humano.

En un aspecto más, la invención provee formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ provistos en esta solicitud, por ejemplo, para el uso en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ provistos en esta solicitud y un portador aceptable para uso farmacéutico. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ provistos en esta solicitud y por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe en la presente solicitud.

Las terapias de combinación que se describen en esta solicitud abarcan la administración combinada (donde se incluyen dos, tres, cuatro o más agentes terapéuticos en las mismas o separadas formulaciones) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede producirse antes o después de la administración del agente terapéutico adicional o del coadyuvante, o en forma simultánea con dicha administración. Los anticuerpos de la invención además pueden usarse en combinación con terapia de radiación.

En ciertas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un antagonista de VEGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF tal como bevacizumab). En algunas realizaciones, los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ se administran en combinación con un antagonista de VEGF. El anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ y el agente adicional (por ejemplo, un antagonista de VEGF) pueden administrarse en forma conjunta o

sucesiva. Alternativamente, el sujeto puede tratarse con el antagonista de VEGF, y posteriormente, puede administrarse el antagonista de $\alpha 5\beta 1$, por ejemplo, el tratamiento con el antagonista de VEGF hasta que el sujeto ya no responde al tratamiento con el antagonista de VEGF, y luego, el tratamiento del sujeto con un antagonista de $\alpha 5\beta 1$. De acuerdo con una realización, el sujeto se trata con un antagonista de VEGF cuando el cáncer es no invasivo, y luego se trata con el antagonista de $\alpha 5\beta 1$, cuando el cáncer es invasivo. Algunos pacientes que experimentan elevadas concentraciones de $\alpha 5\beta 1$ naturalmente o en respuesta a la terapia del antagonista de VEGF, en comparación con pacientes no enfermos o con el control, pueden responder especialmente a este tratamiento de combinación. Se contemplan las combinaciones que además comprenden un agente terapéutico (por ejemplo, un agente antineoplásico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento y un agente citotóxico). Por ejemplo, los pacientes que deben tratarse con quimioterapia (por ejemplo, irinotecano) y antagonistas de $\alpha 5\beta 1$, o que han sido tratados con quimioterapia y antagonistas de $\alpha 5\beta 1$, pueden beneficiarse con la terapia del antagonista de VEGF. Alternativamente, los pacientes que han sido tratados con quimioterapia y antagonistas de VEGF pueden beneficiarse con la terapia de antagonista de $\alpha 5\beta 1$. En una realización, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab. En otra realización, el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ es un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ descrito en esta solicitud.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse por cualquier vía adecuada, que incluye las vías parenteral, intrapulmonar e intranasal, y si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. La dosificación puede efectuarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como las inyecciones intravenosa o subcutánea, de acuerdo, en parte, con el tipo de administración, a decir, breve o crónica. Se contemplan en esta invención diversos programas de dosificación, que incluyen, sin limitación, administraciones individuales o múltiples en diversos momentos, la administración de bolo y la infusión por pulsos.

Los anticuerpos de la invención serán formulados, dosificados y administrados de manera consecuente con las prácticas clínicas correctas. Los factores por considerar en este contexto incluyen el trastorno particular tratado, el mamífero particular tratado, el estado de salud del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por los médicos. No es necesaria, sino opcional, la formulación del anticuerpo con uno o más agentes utilizados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos agentes adicionales depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores descriptos anteriormente. Estos agentes adicionales se usan, en general, en las mismas dosificaciones y con las vías de administración que se describen en esta solicitud, o de aproximadamente 1 a 99% de las dosificaciones que se describen en esta solicitud, o en cualquier dosificación y por cualquier vía determinada apropiada empírica o clínicamente.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad por tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y el curso de la enfermedad, el propósito de la administración del anticuerpo, a decir, preventivo o terapéutico, el tratamiento previo, los antecedentes clínicos del paciente y su respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico de atención. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una sola vez, o durante un curso de tratamientos. De acuerdo con el tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg –10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, ya sea por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de alrededor de 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg o más, conforme a los factores mencionados con anterioridad. Para administraciones repetidas durante varios días o períodos mayores, de acuerdo con la afección, el tratamiento generalmente será sostenido

hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas. Una dosificación ejemplar del anticuerpo se encuentra en el rango de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las anteriores). Dichas dosis pueden administrarse en forma intermitente, por ejemplo, una vez por semana, o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El avance de este tratamiento se controla fácilmente por medio de ensayos y técnicas convencionales.

De acuerdo con la indicación por tratar y con factores pertinentes a la dosificación que un médico en el campo tenga conocimiento, los anticuerpos de la invención se administrarán con una dosificación eficaz para el tratamiento de dicha indicación, y a la vez, se minimizan la toxicidad y los efectos secundarios.

Los tratamientos contra el cáncer pueden evaluarse, por ejemplo, sin limitación, mediante la regresión del tumor, el peso o encogimiento de tamaño del tumor, el tiempo hasta el avance, la duración de la sobrevida, la sobrevida libre de avance, el índice de respuesta general, la duración de la respuesta, la calidad de vida, la expresión de proteína y la actividad. Debido a que los agentes antiangiogénicos que se describen en esta solicitud se dirigen a la vasculatura tumoral y no necesariamente a las células neoplásicas en sí mismas, representan una clase única de fármacos antineoplásicos, y por lo tanto, pueden requerir medidas y definiciones de respuesta clínica a los fármacos de carácter único. Por ejemplo, el encogimiento tumoral superior al 50% en un análisis bidimensional es el corte estándar para la declaración de una respuesta. Sin embargo, los antagonistas para $\alpha 5\beta 1$ y antagonistas de VEGF de la invención pueden causar la inhibición de la diseminación metastásica sin encogimiento del tumor primario, o pueden simplemente ejercer un efecto carcinostático. En consecuencia, pueden emplearse enfoques para la determinación de la eficacia de la terapia, que

incluyen, por ejemplo, la medición de marcadores plasmáticos o urinarios de la angiogénesis y la medición de la respuesta a través de imágenes radiológicas.

La evaluación de los tratamientos para la degeneración macular relacionada con la edad (AMD, por sus siglas en inglés) incluye, sin limitación, una disminución en el índice de la pérdida de visión adicional, o la prevención de mayor pérdida de visión. Para la terapia contra la AMD, la eficacia *in vivo* puede medirse, por ejemplo, mediante una o más de las siguientes pruebas: la evaluación del cambio medio en la mejor agudeza visual corregida (BCVA, por sus siglas en inglés) desde el valor inicial hasta un momento deseado; la evaluación de la proporción de sujetos que pierden menos de 15 letras en la agudeza visual, en un momento deseado, en comparación con el valor inicial; la evaluación de la proporción de sujetos que ganan 15 letras o más en la agudeza visual en un momento deseado, en comparación con el valor inicial; la evaluación de la proporción de sujetos con una agudeza visual Snellen equivalente a 20/2000 o menos, en un momento deseado; la evaluación del Cuestionario de Funcionamiento Visual NEI; la evaluación del tamaño de CNV (sigla en inglés de "neovascularización coroidal") y la cantidad de pérdida de CNV en un momento deseado, evaluado por medio de la angiografía de fluoresceína; y similares.

V. Formulaciones farmacéuticas.

Los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ pueden formularse con portadores o excipientes adecuados, de manera de ser apropiados para la administración. Las formulaciones adecuadas de los anticuerpos se obtienen por medio de la mezcla de un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza, con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)*), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores, en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen reguladores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil

amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, butil o bencil alcohol; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Ejemplos de formulaciones de anticuerpos se describen en el documento WO 98/56418, expresamente incorporado en la presente solicitud a modo de referencia. Ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables en esta invención además incluyen agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glicoproteínas hialuronidasa neutras-activas solubles (sHASEGP, por sus siglas en inglés), por ejemplo, glicoproteínas hialuronidasa PH-20 humanas solubles, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertos ejemplos de sHASEGPs y métodos de uso, que incluyen rHuPH20, se describen en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nros. 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glicosaminoglicanasas adicionales, tales como condroitinasas. Las formulaciones liofilizadas adaptadas para la administración subcutánea se describen en el documento WO 97/04801. Dichas formulaciones liofilizadas pueden ser reconstituidas con un diluyente adecuado hasta una alta concentración de proteína, y la formulación reconstituida puede administrarse por vía subcutánea al mamífero por ser tratado en esta invención.

La formulación de la presente invención además puede contener más de un compuesto activo según lo necesario para la indicación particular tratada, preferentemente, aquellos compuestos con actividades complementarias que no

sean afectados de manera adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser conveniente proporcionar adicionalmente un agente antineoplásico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente citotóxico, y un agente quimioterapéutico. Dichas moléculas se presentan adecuadamente en combinación, en cantidades eficaces para el propósito propuesto. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de enfermedad, trastorno o tratamiento, y otros factores mencionados anteriormente. Estos compuestos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con las vías de administración que se describen en esta solicitud, o de aproximadamente 1 a 99% de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

Los ingredientes activos también pueden presentarse encerrados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por medio de la polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan, por ejemplo, en la referencia *Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition*, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden formularse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, donde las matrices se presentan en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli-(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de los Estados Unidos Nro. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etilenvinil acetato no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tales como LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y leuprolida acetato), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Pueden usarse lipofectinas o liposomas a fin de suministrar los polipéptidos y anticuerpos o las composiciones de esta invención, a las células. Cuando se usan fragmentos de anticuerpos, se usa el fragmento inhibitorio más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína blanco. Por ejemplo, sobre la base de las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas de péptidos que retienen la capacidad para unirse a la secuencia de proteína blanco. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente, o pueden producirse por medio de la tecnología de ADN recombinado. Ver, por ejemplo, la referencia de Marasco *et al.*, *PNAS USA*, 90: 7889–7893 (1993).

Los ingredientes activos también pueden estar encerrados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por medio de la polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan, por ejemplo, en la referencia *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*.

Pueden formularse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, donde las matrices se presentan en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli-(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de los Estados Unidos Nro. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etilenvinil acetato no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y leuprolida acetato), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Si bien los polímeros tales como etilenvinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos.

Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo durante mucho tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como consecuencia de la exposición a la humedad a 37°C, para provocar una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización, de acuerdo con el mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S–S intermoleculares a través del intercambio tio–disulfuro, la estabilización puede lograrse mediante la modificación de residuos sulfhidrilo, la liofilización a partir de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, el uso de aditivos apropiados y el desarrollo de composiciones de matrices poliméricas específicas.

Las formulaciones por ser utilizadas para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra sin dificultad por medio de la filtración a través de membranas de filtración estériles.

VI. Métodos de diagnóstico e imágenes usando anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$.

Los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ marcados y sus derivados y análogos que se unen específicamente a un polipéptido $\alpha 5\beta 1$ pueden usarse con propósitos de diagnóstico a fin de detectar, diagnosticar, o controlar enfermedades o trastornos asociados con la expresión, la expresión anormal o la actividad de $\alpha 5\beta 1$. Por ejemplo, los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ de la invención pueden usarse en ensayos de diagnóstico o ensayos de imágenes *in situ*, *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.

Los métodos para la detección de la expresión de un polipéptido $\alpha 5\beta 1$ comprenden: (a) el ensayo de la expresión del polipéptido en células (por ejemplo, tejido) o líquido corporal de un individuo, usando uno o más anticuerpos de esta invención; y (b) la comparación del nivel de expresión de gen con el nivel de expresión de gen estándar, donde un incremento o una disminución en el nivel de expresión de gen ensayado en comparación con el nivel de expresión estándar es indicativo de la expresión anormal.

Realizaciones adicionales de la invención incluyen métodos de diagnóstico de una enfermedad o un trastorno asociado con la expresión o expresión anormal de $\alpha 5\beta 1$ en un animal (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano). Los métodos comprenden la detección de moléculas $\alpha 5\beta 1$ en el mamífero. En una realización, después de la administración de un antagonista de VEGF, el diagnóstico comprende: (a) la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ marcado, a un mamífero; (b) un intervalo de tiempo, luego de la administración, a fin de permitir que el anticuerpo para $\alpha 5\beta 1$ marcado se concentre preferencialmente en sitios en el sujeto donde se expresa la molécula $\alpha 5\beta 1$ (y para que la molécula marcada no ligada sea aclarada hasta el nivel de fondo); (c) la determinación del nivel de fondo; y (d) la detección de la molécula marcada en el sujeto, de modo que la detección de la molécula marcada, sobre el nivel de fondo, indica que el sujeto tiene una enfermedad o un trastorno particular asociado con la expresión o expresión anormal de $\alpha 5\beta 1$. El nivel de fondo puede determinarse por diversos métodos, que incluyen la comparación de la cantidad de molécula marcada detectada, con un valor estándar previamente determinado para un sistema particular.

Los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ de la invención pueden usarse a fin de ensayar concentraciones o niveles de proteína en una muestra biológica, usando métodos clásicos inmunohistológicos conocidos por el experto en el arte (por ejemplo, ver las referencias de Jalkanen, *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 101: 976–985 (1985); Jalkanen, *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 105: 3087–3096 (1987)). Otros métodos sobre la base de anticuerpos, útiles para la detección de la expresión de genes de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunsorbente ligado a enzima (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Las marcas de ensayo de anticuerpos adecuadas son conocidas en el arte, e incluyen marcas enzimáticas, tales como glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio ($^{115\text{m}}\text{In}$, $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{112}In , ^{111}In) y tecnecio (^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenon (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr ,

^{105}Rh , ^{97}Ru ; luminol; y marcas fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Pueden aplicarse técnicas conocidas en el arte, a los anticuerpos marcados de la invención. Dichas técnicas incluyen, sin limitación, el uso de agentes de conjugación bifuncionales (ver, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos Nros. 5.756.065; 5.714.631; 5.696.239; 5.652.361; 5.505.931; 5.489.425; 5.435.990; 5.428.139; 5.342.604; 5.274.119; 4.994.560; y 5.808.003).

De acuerdo con una realización específica, se determina la expresión o sobreexpresión de polipéptido $\alpha 5\beta 1$ en un ensayo de diagnóstico o pronóstico luego de la administración de un agente terapéutico antagonista de VEGF, mediante la evaluación de los niveles o las concentraciones de $\alpha 5\beta 1$ presentes sobre la superficie de una célula (por ejemplo, por medio de un ensayo de inmunohistoquímica usando anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$). Alternativa o adicionalmente, pueden medirse las concentraciones de ARNm o ácido nucleico codificador de polipéptido $\alpha 5\beta 1$ en la célula, por ejemplo, por medio de la hibridación fluorescente *in situ* usando una sonda a base de ácido nucleico que corresponde a un ácido nucleico codificador de $\alpha 5\beta 1$, o su complemento; (FISH; ver WO 98/45479, publicada en octubre de 1998), por medio de técnicas *Southern blotting*, *Northern blotting*, o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), tal como la PCR en tiempo real cuantitativa (RT-PCR, por sus siglas en inglés). Además, puede estudiarse la sobreexpresión de $\alpha 5\beta 1$ midiendo el antígeno derramado en un líquido biológico tal como suero, por ejemplo, usando ensayos sobre la base de anticuerpos (ver, además, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos Nro. 4.933.294, publicada el 12 de junio de 1990; WO 91/05264, publicada el 18 de abril de 1991; Patente de los Estados Unidos Nro. 5.401.638, publicada el 28 de marzo de 1995; y la referencia de Sias *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 132: 73–80 (1990)). Además de los ensayos anteriores, el experto en el arte podrá obtener diversos ensayos *in vivo* y *ex vivo*. Por ejemplo, pueden exponerse las células dentro del organismo del mamífero, a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con una marca detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y puede evaluarse la unión del anticuerpo, por ejemplo, por medio del barrido externo para

establecer la radiactividad, o mediante el análisis de una muestra (por ejemplo, una biopsia u otra muestra biológica) tomada de un mamífero previamente expuesto al anticuerpo.

VII. Artículos de fabricación y equipos.

Otra realización de la invención comprende un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, tumores), enfermedades oculares (por ejemplo, ADM húmeda) o enfermedades autoinmunitarias y afecciones relacionadas. El artículo de fabricación puede comprender un recipiente y un rótulo o un prospecto sobre el recipiente o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados abarcan, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, como vidrio o plástico. En general, el recipiente contiene una composición que es eficaz para el tratamiento de la afección, y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón para punción con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un ingrediente activo en la composición es un antagonista de VEGF, un antagonista de $\alpha 5\beta 1$, o un agonista de VEGF, o un agonista de $\alpha 5\beta 1$ de la invención. El rótulo o el prospecto indica que la composición se usa para el tratamiento de la afección particular. El rótulo o el prospecto además comprenderá instrucciones para la administración de la composición de anticuerpo al paciente. Se contemplan además los artículos de fabricación y los equipos que comprenden las terapias de combinación que se describen en esta solicitud.

El prospecto se refiere a las instrucciones habitualmente incluidas en prospectos comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, administración, las contraindicaciones y advertencias que se relacionan con el uso de dichos productos terapéuticos.

Además, el artículo de fabricación puede comprender un segundo recipiente que comprende un regulador farmacéuticamente aceptable, tal como agua

bacteriostática para inyección (BWFI, por sus siglas en inglés), solución salina regulada con fosfato, solución de cloruro sódico compuesta y solución de dextrosa. Asimismo, puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, por ejemplo, otros reguladores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Asimismo, se proveen equipos que son útiles para diversos propósitos, por ejemplo, para el aislamiento o la detección de $\alpha 5\beta 1$ y/o VEGF en pacientes, opcionalmente, en combinación con los artículos de fabricación. Para el aislamiento y la purificación de $\alpha 5\beta 1$, el equipo puede contener un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ acoplado a cuentas (por ejemplo, cuentas de sefarosa). Pueden proporcionarse equipos que contienen los anticuerpos para la detección y cuantificación de $\alpha 5\beta 1$ y/o VEGF *in vitro*, por ejemplo, en un ensayo ELISA o un *Western blot*. Como con el artículo de fabricación, el equipo comprende un recipiente y un rótulo o un prospecto sobre el recipiente, o asociado con el recipiente. Por ejemplo, el recipiente contiene una composición que comprende por lo menos un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ de la invención. Pueden incluirse recipientes adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes y reguladores, y anticuerpos de control. El rótulo o el prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición, al igual que instrucciones para el uso propuesto *in vitro* o de diagnóstico.

Los reactivos comerciales mencionados en los Ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. La fuente de dichas células identificadas en los siguientes Ejemplos y a lo largo de la memoria descriptiva, por los números de acceso ATCC, es la Colección de Cultivos de Tipo Norteamericano (American Type Culture Collection), Manassas, VA. A menos que se observe lo contrario, la presente invención utiliza procedimientos convencionales de tecnología de ADN recombinado, tales como aquellos descritos con anterioridad y en los siguientes libros de texto: Sambrook *et al.*, *supra*; Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989); Innis *et al.*, PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS (Academic Press, Inc.: N.Y.,

1990); Harlow *et al.*, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988); Gait, OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (IRL Press: Oxford, 1984); Freshney, ANIMAL CELL CULTURE, 1987; Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, 1991.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen a fin de ilustrar, y no de limitar, la invención reivindicada. Los expertos en el arte reconocerán sin dificultad una diversidad de parámetros no decisivos que pueden ser cambiados o modificados a fin de lograr esencialmente los mismos resultados.

Ejemplo 1. Materiales y métodos.

A. Análisis BIAcore.

A fin de determinar la cinética de unión y las afinidades de los anticuerpos que se describen en esta solicitud, se usó la medición de la resonancia de plasmón de superficie (SRP, por sus siglas en inglés) con un instrumento BIAcore™-3000. El anticuerpo se capturó primero por medio de un chip sensor Fc CM5 antihumano de conejo previamente inmovilizado, en la celda de flujo diferente, a fin de lograr aproximadamente 150 UR (Unidades de Respuesta). Para las mediciones de cinética, se inyectaron diluciones sucesivas del doble, de integrina humana $\alpha 5\beta 1$ (300 nM a 1,2 nM), en regulador PBT (PBS con Tween 20 al 0,05%) a 25°C, con un caudal de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Se calcularon los índices de asociación (k_{on}) y los índices de disociación (k_{off}) usando un modelo simple de unión de Langmuir de uno a uno (BIAcore Evaluation Software versión 3.2). Se calculó la constante de disociación de equilibrio (K_D) como la relación $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$.

B. Ensayo de unión de fibronectina con células U937.

Se agregaron 100 μl de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fibronectina (R & D Systems) diluida en PBS, pH 7,4, a los receptáculos de placas de 96 receptáculos (Nuch MaxiSorp), y se incubaron durante la noche a 2–8°C. Las placas se lavaron tres veces con 200 μl de PBS, pH 7,4. Se agregaron 200 μl de PBS, pH 7,4/BSA al 1% a todos los

receptáculos, y las placas se incubaron durante por lo menos 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación moderada. Las placas se lavaron tres veces con 200 μ l de PBS, pH 7,4.

Se agregaron 50 μ l de anticuerpo anti- α 5 β 1 diluido, a cada receptáculo (10 μ g/ml diluido sucesivamente a 1:3, 10 veces), seguido de inmediato de 50 μ l de células U937 (ATCC, Cat. # CRL-1593.2) en una concentración de 1×10^6 células/ml en medio de ensayo (RPMI 1640 (Media Prep A0806), 5 mg/ml de BSA, L-glutamina, 1 mM; $MgCl_2$, 1 mM).

Las placas se incubaron durante 30 min a 37°C; las células no ligadas se desecharon, y las placas se lavaron dos veces con 150 μ l de medio de ensayo. Se agregaron a cada receptáculo 100 μ l de medio de ensayo y 100 μ l de brillo de valoración celular (Cell-Titer Glow (Promega Cat. # G7573)). Se incubaron las placas durante 10–15 minutos a temperatura ambiente y se cubrieron. Se detectó la luminiscencia en un lector de placa VICTOR ²V (Perkin-Elmer), y las unidades de luminiscencia se analizaron en relación con la concentración de los anticuerpos utilizados en el ensayo, usando un ajuste de cuadrados menores no lineal de cuatro parámetros, para obtener los valores IC₅₀.

C. Ensayo de unión de fibronectina con α 5 β 1.

Se agregaron 25 μ l de 1 μ g/ml de fibronectina (R & D Systems) diluida en PBS, a los receptáculos de placas de 384 receptáculos (Nucn MaxiSorp), y se incubaron durante la noche a 2–8°C. Las placas se lavaron tres veces con 80 μ l de regulador PBT. Se agregaron 50 μ l de PBS/BSA al 1% a todos los receptáculos, las placas se incubaron durante por lo menos 60 minutos a temperatura ambiente con agitación moderada, luego se lavaron 3 veces con 80 μ l de regulador PBT.

El anticuerpo anti- α 5 β 1 (30 μ g/ml) se diluyó en forma sucesiva a 1:3, 11 veces. Se agregaron 50 μ l del anticuerpo anti- α 5 β 1 sucesivamente diluido a microtubos de 0,65 ml, y se premezclaron (1:1) con 50 μ l de 200 ng/ml de α 5 β 1 (R & D Systems) en regulador ELISA (NaCl, 150 mM; Tris, 10 mM, pH 7,5; 5 mg/ml BSA; $MnCl_2$, 1 mM), durante 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación moderada. Se agregaron 25 μ l de la α 5 β 1 y el anticuerpo anti- α 5 β 1

premezclados, a los receptáculos revestidos con fibronectina, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos con agitación moderada. Las placas se lavaron 6 veces con regulador PBT; se agregaron a cada receptáculo 100 ng/ml de anti- β 1-biotina en regulador ELISA, y las placas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación moderada. Las placas se lavaron 6 veces con 80 μ l de regulador PBT; se agregaron a cada receptáculo 25 μ l de estreptavidina-HRP (1:50.000 en regulador ELISA, GE Healthcare), y las placas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación moderada. Las placas se lavaron 6 veces con 80 μ l de regulador PBT; se agregaron a cada receptáculo 25 μ l de sustrato TMB (Kirkgaard and Perry Laboratories), y las placas se incubaron alrededor de 6 minutos a temperatura ambiente; la reacción se detuvo con 25 μ l de ácido fosfórico, 1 M. Se leyó la absorbancia a 450 nm, y se analizaron los valores IC_{50} como se describe en la sección B anterior.

D. Ensayo de migración HUVEC.

Se cultivaron células HUVEC en medio estándar hasta 80% de confluencia. Las células se tripsinaron, se contaron y se resuspendieron en medio EBM-2 con BSA al 0,1% en una concentración de 5×10^5 células/ml. Para el ensayo, se colocaron en placa 100 μ l de células (5×10^4 células/receptáculo) por receptáculo, en una placa BD Falcon HTS Multiwell System de 24 receptáculos (BD Ref.: 351185, tamaño de poro de 8 μ m). Las placas HTS se revistieron previamente con fibronectina (1–2 μ g/ml) durante la noche. Las placas se lavaron con PBS, y se agregaron 500 μ l (EBM con BSA al 0,1%) de solución, a la cámara inferior. Para cada muestra, se usaron 3–6 receptáculos. No se agregó estímulo de migración (por ejemplo, VEGF) al receptáculo de control negativo.

Para iniciar el ensayo, se agregaron 100 μ l de células (5×10^4 células/receptáculo) a la cámara superior. La cámara inferior contenía 500 μ l de medio (EBM con BSA al 0,1%). Los anticuerpos antiintegrina $\alpha 5\beta 1$ y los controles de isotipo se agregaron generalmente a la cámara superior con las células en una

concentración final de 0 µg/ml, 1 µg/ml o 5 µg/ml, y se incubaron durante 15 minutos antes de agregar el estímulo de migración (VEGF) a la cámara inferior.

Se agregó el estímulo a la cámara inferior (10 ng/ml VEGF-A), y las placas se incubaron 4–6 horas, o durante la noche. Las células se rasparon de la cámara superior usando un fregado de esponja; se agregó PBS, y luego las células de la cámara superior se rasparon nuevamente. El medio se drenó de la cámara inferior, y las células se fijaron con 500 µl de metanol al 100% durante 5 minutos.

Luego las células se tiñeron con 500 µl de tinción de ácido nucleico SYTOX® Green (dilución de 1:5000 ó 1:10000 en PBS) (Molecular Probes S7020) durante por lo menos 10 min (en la oscuridad). A continuación, se usó un microscopio a fin de tomar fotografías individuales de cada receptáculo. Las fotografías se tomaron usando un programa AxioVision AC y un objetivo de 5 x.

Se usó ImageJ a fin de analizar los resultados (mínimo de 5 píxeles, bin 5). Se registró la cantidad de células por receptáculo y se analizó usando Microsoft Excel.

Ejemplo 2. Generación de anticuerpos anti-α5β1.

Se generaron anticuerpos anti-α5β1 mediante la inmunización de hámsteres con polipéptidos de dominio extracelular α5β1 humanos recombinados. Se seleccionó el clon de anticuerpo monoclonal de hámster 18C12, que comprendía las secuencias VH y VL expuestas en las Figuras 1 y 2.

Se generaron dos versiones de 18C12, h18C12.v1.1 y h18C12.v2.1 de hámster quimérico, mediante la clonación de la cadena liviana del 18C12 de hámster, en dos marcos de consenso VL_{kappa1}/VH_{III}: h18C12.v1.1 y h18C12.v2.1, que diferían solo en la región de contacto CDR-H3. Específicamente, la región de contacto CDR-H3 de h18C12.v1.1 comprendía los siguientes residuos: C⁹²A⁹³R⁹⁴, y la región de contacto CDR-H3 de h18C12.v2.1 comprendía los siguientes residuos: C⁹²T⁹³S⁹⁴. Tanto h18C12.v1.1 como h18C12.v2.1 fueron exitosamente exhibidos en fagos en formato Fab, y se observó la unión por ELISA de competición de fagos. No se observaron diferencias significativas en la unión, entre h18C12.v1.1 y h18C12.v2.1. Se seleccionó h18C12.v1.1 para la posterior

humanización. Se generó 18C12.v3 humanizado mediante el cambio de la mayoría del marco de cadena liviana de h18C12.v1.1, para obtener el marco de consenso humano lambda IV, excepto los siguientes residuos en la cadena liviana: Y36, A43 e Y49. Además, se retuvieron los siguientes residuos en el marco VH_{III} humano: G49 y D73.

El h18C12.v3 se sometió a la maduración para afinidad, y se generaron los siguientes clones: h18C12.v6; h18C12.v7; h18C12.v9; h18C12.v15; h18C12.v16; h18C12.v28; h18C12.v30; h18C12.v51; h18C12.v54; h18C12.v70; h18C12.v78. Las secuencias CDR para cada uno de los clones se exponen en la Figura 3. Las secuencias CDR para el clon h18C12.v6 se modificaron de la siguiente manera: CDR-L2: D50cS y D56S; CDR-H1: N31A; y CDR-H2: N53A. Las secuencias CDR modificadas luego se insertaron en un marco humano modificado λ III/VHIII de manera de generar h18C12.v6.1Lam3 (h18C12.v6.1) y h18C12.v6.2Lam3 (h18C12.v6.2). El marco humano modificado λ III para h18C12.v6.1 contenía las siguientes modificaciones: L46Y; V47L; I48M; N69A; A71R; y G77N. El marco humano modificado λ III para h18C12.v6.2 contenía las siguientes modificaciones: N69A; A71R; y G77N. El marco VHIII modificado contenía las siguientes modificaciones: S49G y N73D.

El clon h18C12.v6.1 se modificó adicionalmente de manera de eliminar asparagina (N) en CDR-L2 ($N^{50a}S^{50b}S^{50c}G^{50d}$). Se generaron los siguientes clones: h18C12.v6.1.1; h18C12.v6.1.2; h18C12.v6.1.3; h18C12.v6.1.4; y h18C12.v6.1.5. La secuencia CDR-L2 en las posiciones 50a, 50b, 50c y 50d para cada uno de los clones h18C12.v6.1 se expone en la Figura 7.

Ejemplo 3. ELISA de competición de fagos.

Se revistieron placas de microvaloración MAXISORP™ con integrina humana recombinada $\alpha 5\beta 1$ (R&D), en una concentración de 5 μ g/ml en PBS, durante la noche, y luego se bloquearon con regulador PBST (BSA al 0,5% y Tween 20 al 0,05% en PBS), durante una hora, a temperatura ambiente. Se incubaron los fagos de los sobrenadantes de cultivo con integrina $\alpha 5\beta 1$ humana sucesivamente diluida, en regulador PBST, en una placa de microvaloración de

cultivo de tejido durante una hora; a continuación, se transfirieron 80 μ l de la mezcla a los receptáculos revestidos con el blanco, durante 15 minutos, de manera de capturar el fago no ligado. La placa se lavó con regulador PBT (Tween 20 al 0,05% en PBS), y se agregó anti-M13 conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) (1:5000 en regulador PBST), durante 40 minutos. La placa se lavó con regulador PBT y se desarrolló mediante el agregado de sustrato tetrametilbencidina (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Se trazó la absorbancia a 450 nm como una función de la concentración de blanco en solución a fin de determinar el valor IC_{50} de fago. Este se usó como un cálculo de afinidad para el clon Fab exhibido sobre la superficie del fago. La Figura 4 representa los resultados de un ensayo de competición de fago que demuestra la unión de las variantes maduras para afinidad de 18C12 h18C12.v3; h18C12.v6; h18C12.v7; h18C12.v9; h18C12.v15; h18C12.v16; h18C12.v28; h18C12.v30; h18C12.v51; h18C12.v54; h18C12.v70; y h18C12.v78 a integrina $\alpha 5\beta 1$ humana.

Ejemplo 4. Determinaciones de afinidad de anticuerpo por BIAcore.

A fin de determinar la cinética de unión y las afinidades de 18C12 quimérico, h18C12.v6.1, h18C12.v6.1.1, h18C12.v6.1.2, h18C12.v6.1.3, h18C12.v6.1.4, h18C12.v6.1.5 IgG, se usó la medición de la resonancia de plasmón de superficie (SRP, por sus siglas en inglés) con un instrumento BIAcore™-3000 como se describe en el Ejemplo 1.

La Figura 5 representa los resultados del análisis BIAcore de la unión de las variantes maduras para afinidad de 18C12, a integrina $\alpha 5\beta 1$ humana. La Figura 6 representa los resultados del análisis BIAcore de la unión de 18C12 quimérico (18C12 que comprende las secuencias de hámster VL y VH expuestas en la Figura 1 y la porción Fc de IgG1) y h18C12.v6.1 a integrina $\alpha 5\beta 1$ humana. La información demuestra que h18C12.v6.1 tiene una afinidad de unión para integrina $\alpha 5\beta 1$ humana que es aproximadamente dos veces mayor que la afinidad de unión de 18C12 de hámster para integrina $\alpha 5\beta 1$ humana. La Figura 7 representa los resultados del análisis BIAcore para cada uno de los clones h18C12.v6.1.

Ejemplo 5. Los anticuerpos 18C12 inhiben la unión a fibronectina.

A fin de comparar los efectos de 18C12 quimérico y h18C12.v6.1 o h18C12.v6.1.5 IgG sobre la unión a fibronectina, se usaron los ensayos de unión de fibronectina que se describen en el Ejemplo 1 anterior.

La Figura 8 representa los resultados de un ensayo de unión de fibronectina que compara la capacidad de 18C12 quimérico y h18C12.v6.1 para interferir con la unión de células U937 a fibronectina. La Figura 9 representa los resultados de un ensayo de unión de fibronectina que compara la capacidad de 18C12 de hámster y h18C12.v6.1.5 para interferir con la unión de células U937 a fibronectina. La Figura 10 representa los resultados de un ensayo de unión de fibronectina que compara la capacidad de 18C12 de hámster y h18C12.v6.1.5 para interferir con la unión del dominio extracelular de $\alpha_5\beta_1$ recombinado a fibronectina. La información demuestra que 18C12 de hámster, 18C12 quimérico, h18C12.v6.1 y h18C12.v6.1.5 inhiben la unión de células U937 o el dominio extracelular de $\alpha_5\beta_1$ recombinado, a fibronectina.

Ejemplo 6. Los anticuerpos 18C12 inhiben la migración de HUVEC.

A fin de comparar los efectos de 18C12 quimérico y h18C12.v6.1 IgG sobre la migración de células HUVEC, se usó el ensayo de migración HUVEC que se describe en el Ejemplo 1 anterior.

La Figura 11 representa los resultados de un ensayo de migración HUVEC que compara la capacidad de 18C12 quimérico y h18C12.v6.1 para interferir con la migración de células HUVEC a fibronectina. La información demuestra que 18C12 quimérico y h18C12.v6.1 inhiben la migración de células HUVEC a fibronectina.

Ejemplo 7. Ensayos de desarrollo embrionario.

Se usaron ratones transgénicos α_5 que expresaban una integrina quimérica $\alpha_5\beta_1$ (α_5 humana y β_1 murina), en ensayos de desarrollo embrionario, a fin de demostrar la eficacia de los anticuerpos 18C12 que se describen en esta solicitud. Los ratones transgénicos machos que expresaban α_5 humana y no expresaban α_5

murina se aparearon con ratones hembras que no expresaban $\alpha 5$ humana y que eran heterocigotos para $\alpha 5$ murina. Se inyectó a los ratones preñados, i. p., 10 mg/kg de anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ (h18C12.v6.1.5) o un anticuerpo de control negativo 2 x/semana, iniciando a los 9,5 días posteriores al coito. El día 14,5 posterior al coito, se recogieron los embriones, se genotipificaron, y se evaluó la vasculatura embrionaria. Los resultados se resumen en la tabla que sigue.

Tratamiento	Expresión de integrina $\alpha 5$	Desarrollo vascular
h18C12.v6.1.5	solo $\alpha 5$ humana	Hemorragia, detención de crecimiento y edema sistémico extenso
h18C12.v6.1.5	solo $\alpha 5$ murina	Normal
anticuerpo control negativo	solo $\alpha 5$ humana	Normal
anticuerpo control negativo	solo $\alpha 5$ murina	Normal

Estos resultados demuestran que h18C12.v6.1.5 interrumpe la función de integrina $\alpha 5\beta 1$ *in vivo* durante el desarrollo vascular.

Ejemplo 8. Ensayos de aloinjerto tumoral.

Se usan modelos tumorales de aloinjerto C57/Bl6 en estudios para demostrar la eficacia de los anticuerpos 18C12 que se describen en esta solicitud. Se implantan células tumorales C57/Bl6 en ratones transgénicos de noqueo $\alpha 5$ murina: $\alpha 5$ humana, y los ratones se tratan con anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$.

Los ratones que portan tumores establecidos se asignan en forma aleatoria a cuatro grupos, de modo que todos los grupos tienen volúmenes tumorales iniciales similares. El régimen de dosificación es el siguiente:

- (1) Anticuerpo de control negativo (13,5 mg/kg, 2x/semana).
- (2) Anticuerpo anti-VEGF (3,5 mg/kg, 2x/semana) + Anticuerpo de control negativo (10 mg/kg, 2x/semana).
- (3) Anticuerpo de control negativo (3,5 mg/kg, 2x/semana) + anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ (18C12) (10 mg/kg, 2x/semana).
- (4) Anticuerpo anti-VEGF (3,5 mg/kg, 2x/semana) + anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ (18C12) (10 mg/kg, 2x/semana).

La longitud y el ancho de los tumores se miden dos veces por semana usando calibradores, y los volúmenes tumorales se calculan usando la siguiente fórmula: Volumen tumoral (mm^3) = $(w^2 \times l)/2$, donde w = ancho y l = longitud en mm. Se trazan los volúmenes tumorales contra el tiempo, a fin de reflejar los índices de crecimiento tumorales.

Ejemplo 9. Ensayos de xenoinjerto tumoral.

Se usaron ensayos de xenoinjerto tumoral en estudios para demostrar la eficacia de los anticuerpos 18C12 que se describen en la presente solicitud. Se implantaron células de glioma U87 humanas que albergaban un gen reportero de luciferasa, en el cerebro de ratones atímicos, y los ratones se trataron con anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$.

Se tomaron imágenes de los ratones que portaban tumores establecidos usando imágenes de bioluminiscencia, y se asignaron en forma aleatoria a tres grupos, de modo que todos los grupos tenían una carga tumoral inicial similar. El régimen de dosificación fue el siguiente:

(1) Anticuerpos de control negativo (ambrosia) (5 mg/kg, 2x/semana) + anti-gD (10 mg/kg, 2x/semana).

(2) Anticuerpo anti-VEGF (B20-4.1) (5 mg/kg, 2x/semana) + anticuerpo de control negativo anti-gD (10 mg/kg, 2X/semana).

(3) Anticuerpo anti-VEGF (B20-4.1) (5 mg/kg, 2x/semana) + anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ (h18C12.v6.1.5) (10 mg/kg, 2x/semana).

Se controló diariamente la sobrevida de estos ratones, luego de la implantación quirúrgica de las células tumorales. El tratamiento con el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ h18C12.v6.1.5 en combinación con anti-VEGF mejoró significativamente la sobrevida de los ratones, en relación con el anti-VEGF solo. Los resultados se muestran en la Figura 12. Se midieron además las cargas tumorales en las semanas 1, 3, 4 y 5 después de la implantación, usando imagen de bioluminiscencia. Los ratones tratados con el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ h18C12.v6.1.5 en combinación con anti-VEGF tuvieron una menor carga tumoral

en relación con los ratones tratados con anti-VEGF solo. Los resultados se muestran en la Figura 13.

Todas las publicaciones (que incluyen, por ejemplo, patentes, solicitudes de patente publicadas y Nros. de Acceso Genbank) citadas en la presente solicitud se incorporan expresamente a modo de referencia en su totalidad, para todos los propósitos, como si cada referencia fuera específica e individualmente incorporada a modo de referencia.

Listado de secuencias

<110> GENENTECH, INC.
Liang, Wei-Ching
Plowman, Gregory D.
Wu, Yan
Ye, weilan

<120> NUEVOS ANTICUERPOS ANTI-ALFa 5 Beta 1 Y SUS USOS

<130> P4170R1

<150> US 61/163.241

<151> 25-03-2009

<160> 40

<210> 1

<211> 110

<212> PRT

<213> Humanizado

<220>

<221> Variante

<222> 22-36

<223> X es cualquier aminoácido

<220>

<221> Incierto

<222> 22-36,52-62,95-105

<223> Aminoácido desconocido

<220>

<221> Variante

<222> 52-62

<223> X es cualquier aminoácido

<220>

<221> Variante

<222> 95-105

<223> X es cualquier aminoácido

<400> 1

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

Thr	Val	Arg	Ile	Thr	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				20					25					30

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala
				35					40					45

Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				50					55					60

Xaa	Xaa	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn
				65					70					75

Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala
				80					85					90

Asp	Tyr	Tyr	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				95					100					105

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr
				110

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 2

Gln	Pro	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

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

Thr

<210> 3
<211> 106
<212> PRT
<213> Humanizado

<400> 3
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asn Ser Val Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr	20	25	30
Tyr Thr Ile Gly Trp Tyr Gln Gln His Pro Asp Lys Ala Pro Lys	35	40	45
Tyr Val Met Tyr Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp	50	55	60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala His Arg	65	70	75
Tyr Leu Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr	80	85	90
Phe Cys Gly Ser Ser Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Phe Gly Ser Gly	95	100	105

Thr

<210> 4
<211> 106
<212> PRT
<213> Humanizado

<400> 4
Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr	20	25	30
Tyr Thr Ile Gly Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Arg	35	40	45
Tyr Leu Met Tyr Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp	50	55	60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg	65	70	75
Tyr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr			

80 85 90
 Tyr Cys Gly Ser Ser Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105

Thr

<210> 5
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Humanizado

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

Thr

<210> 6
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Humanizado

<400> 6
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Thr Ile Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
 35 40 45
 Tyr Leu Met Tyr Leu Asn Ser Ser Gly Ser His Asn Lys Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Thr Arg
 65 70 75
 Ser Leu Thr Ile Thr Asn Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Ala Ala Tyr Tyr Ala Tyr Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105

Thr

<210> 7
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Humanizado

<400> 7

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

<210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Humanizado

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

<210> 9
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Cricetulus griseus

<400> 9
 Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Asn Arg Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Gly Ile Lys Thr Lys Pro Asn Ile Tyr Ala Thr
 50 55 60
 Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 65 70 75

Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Val
80 85 90

Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Ser Leu Thr Gly Met Arg
95 100 105

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
110

<210> 10
<211> 116
<212> PRT
<213> Humanizado

<220>
<221> Variante
<222> 26-35
<223> X es cualquier aminoácido

<220>
<221> Incierto
<222> 26-35, 52-70, 103-111
<223> Aminoácido desconocido

<220>
<221> Variante
<222> 52-70
<223> X es cualquier aminoácido

<220>
<221> Variante
<222> 103-111
<223> X es cualquier aminoácido

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

<210> 11
<211> 114
<212> PRT
<213> Humanizado

<400> 11
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
Asn Arg Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Gly Ile Lys Thr Lys Pro Asn Ile Tyr Ala Thr

	50		55		60
Glu Tyr Ala Asp Ser	Val Lys Gly Arg Phe	Thr Ile Ser Arg Asp			
	65		70		75
Asp Ser Lys Asn Thr	Leu Tyr Leu Gln Met	Asn Ser Leu Arg Ala			
	80		85		90
Glu Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys Ala Arg	Leu Thr Gly Met Arg			
	95		100		105
Tyr Phe Asp Tyr Trp	Gly Gln Gly Thr				
	110				

<210> 12
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Humanizado

<400> 12	
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
Asn Arg Trp Ile Tyr	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
	35 40 45
Glu Trp Val Gly Gly	Ile Lys Thr Lys Pro Asn Ile Tyr Ala Thr
	50 55 60
Glu Tyr Ala Asp Ser	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
	65 70 75
Asp Ser Lys Asn Thr	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
	80 85 90
Glu Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Met Lys
	95 100 105
Tyr Phe Asp Tyr Trp	Gly Gln Gly Thr
	110

<210> 13
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Humanizado

<400> 13	
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
Ala Arg Trp Ile Tyr	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
	35 40 45
Glu Trp Val Gly Gly	Ile Lys Thr Lys Pro Ala Ile Tyr Ala Thr
	50 55 60
Glu Tyr Ala Asp Ser	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
	65 70 75
Asp Ser Lys Asn Thr	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
	80 85 90
Glu Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Met Lys
	95 100 105
Tyr Phe Asp Tyr Trp	Gly Gln Gly Thr
	110

<210> 14

<211> 114
 <212> PRT
 <213> Humanizado

<400> 14
 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
 Ala Arg Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Gly Ile Lys Thr Lys Pro Ala Ile Tyr Ala Thr
 50 55 60
 Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 65 70 75
 Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 80 85 90
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Met Lys
 95 100 105
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 110

<210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> la secuencia es sintetizada

<220>
 <221> Variante
 <222> 3
 <223> X es S o T

<220>
 <221> Variante
 <222> 4
 <223> X es S, P, o T

<220>
 <221> Variante
 <222> 5
 <223> X es Q o N

<220>
 <221> Variante
 <222> 7
 <223> X es F o S

<220>
 <221> Variante
 <222> 8
 <223> X es T o I

<220>
 <221> Variante
 <222> 10
 <223> X es K o T

<220>
 <221> Variante
 <222> 12
 <223> X es G, D, o S

<400> 15
 Thr Leu Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Tyr Xaa Ile Xaa
 5 10

```
<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

<220>
<223> la secuencia es sintetizada

```
<220>  
<221> variante  
<222> 1  
<223> X es L o I
```

```
<220>  
<221> variante  
<222> 2  
<223> X es N o T
```

```
<220>
<221> Variante
<222> 4
<223> X es D, H, o S
```

```
<220>  
<221> Variante  
<222> 5  
<223> X es G o S
```

```
<220>
<221> variante
<222> 6
<223> X es S, L, o T
```

```
<220>  
<221> variante  
<222> 7  
<223> X es H o Y
```

```
<220>
<221> variante
<222> 8
<223> X es N, K, Q o I
```

```
<220>  
<221> variante  
<222> 9  
<223> X es K o T
```

```
<220>  
<221> Variante  
<222> 10  
<223> X es G o A
```

```
<220>
<221> variante
<222> 11
<223> X es D, S, o V
```

<400> 16
Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
5 10

```
<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

<220>
<223> la secuencia es sintetizada

```
<220>  
<221> Variante  
<222> 1  
<223> X es G o A
```

<220>
<221> Variante
<222> 2
<223> X es S, A, o Y

<220>
<221> Variante
<222> 3
<223> X es S o Y

<220>
<221> Variante
<222> 5
<223> X es S, A, o Y

<220>
<221> Variante
<222> 6
<223> X es S, Y, o T

<220>
<221> Variante
<222> 9
<223> X es V o I

<400> 17
Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Gly Tyr Xaa
5

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia es sintetizada

<220>
<221> Variante
<222> 6
<223> X es N o A

<220>
<221> Variante
<222> 9
<223> X es I o V

<400> 18
Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Arg Trp Xaa Tyr
5 10

<210> 19
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia es sintetizada

<220>
<221> Variante
<222> 7
<223> X es N, A, o T

<220>
<221> Variante
<222> 8
<223> X es I o R

<220>
<221> Variante
<222> 12
<223> X es E o Q

<400> 19
 Gly Ile Lys Thr Lys Pro Xaa Xaa Tyr Ala Thr Xaa Tyr Ala Asp
 1 5 10 15

Ser Val Lys Gly

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 1a secuencia es sintetizada

<220>
 <221> Variante
 <222> 1
 <223> X es L o V

<220>
 <221> Variante
 <222> 4
 <223> X es M o K

<220>
 <221> Variante
 <222> 5
 <223> X es R o K

<400> 20
 Xaa Thr Gly Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr
 5

<210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 1a secuencia es sintetizada

<400> 21
 Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Gly
 5 10

<210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 1a secuencia es sintetizada

<400> 22
 Thr Leu Ser Pro Gln His Phe Thr Tyr Lys Ile Asp
 5 10

<210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 1a secuencia es sintetizada

<400> 23
 Thr Leu Ser Ser Asn His Ser Ile Tyr Thr Ile Ser
 5 10

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 1a secuencia es sintetizada

 <400> 24
 Thr Leu Thr Thr Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Gly
 5 10

 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 1a secuencia es sintetizada

 <400> 25
 Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp
 5 10

 <210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 1a secuencia es sintetizada

 <400> 26
 Ile Asn Ser Asp Gly Ser His Lys Lys Gly Val
 5 10

 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 1a secuencia es sintetizada

 <400> 27
 Leu Thr Ser His Gly Leu His Gln Lys Gly Val
 5 10

 <210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 1a secuencia es sintetizada

 <400> 28
 Leu Asn Ser Asp Ser Thr Tyr Ile Thr Ala Val
 5 10

 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 1a secuencia es sintetizada

 <400> 29
 Gly Ser Ser Tyr Ser Ser Gly Tyr Val
 5

 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 1a secuencia es sintetizada

Ser Val Lys Gly

<210> 37
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 1a secuencia es sintetizada

<400> 37
Gly Ile Lys Thr Lys Pro Thr Arg Tyr Ala Thr Gln Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 1a secuencia es sintetizada

<400> 38
Leu Thr Gly Met Arg Tyr Phe Asp Tyr
5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 1a secuencia es sintetizada

<400> 39
Leu Thr Gly Met Lys Tyr Phe Asp Tyr
5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 1a secuencia es sintetizada

<400> 40
Val Thr Gly Met Arg Tyr Phe Asp Tyr
5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ que comprende:
 - un dominio VL que comprende una CDR-L1 que comprende TL-S/T-S/P/T-Q/N-H-F/S-T/I-Y-K/T-I-G/D/S (SEC. ID. NRO.: 15); una CDR-L2 que comprende L/I-N/T-S-D/H/S-G/S-S/L/T-H/Y-N/K/Q/I-K/T-G/A-D/S/V (SEC. ID. NRO.: 16); una CDR-L3 que comprende G/A-S/A/Y-S/Y-Y-S/A/Y-S/Y/T-GY-V/I (SEC. ID. NRO.: 17); y
 - un dominio VH que comprende una CDR-H1 que comprende GFTFS-N/A-RW-I/V-Y (SEC. ID. NRO.: 18); una CDR-H2 que comprende GIKTKP-N/A/T-I/R-YAT-E/Q-YADSVKG (SEC. ID. NRO.: 19); y una CDR-H3 que comprende LV-TG-M/K-R/K-YFDY (SEC. ID. NRO.: 20).
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde:
 - el dominio VL comprende una CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde cada una comprende una secuencia expuesta en la Figura 3; y
 - el dominio VH comprende una CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde cada una comprende una secuencia expuesta en la Figura 3.
3. El anticuerpo anti- $\alpha_5\beta_1$ de la reivindicación 1, donde:
 - el dominio VL comprende cualquiera de SEC. ID. NROS.: 3-8; y
 - el dominio VH comprende cualquiera de SEC. ID. NROS.: 11-14.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde:
 - el dominio VL comprende SEC. ID. NRO.: 8; y
 - el dominio VH comprende SEC. ID. NRO.: 14.
5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es un anticuerpo humano, humanizado, quimérico, biespecífico o multiespecífico.

6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1–4, que es un fragmento de anticuerpo que se une a $\alpha 5\beta 1$.
7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1–4, que es un anticuerpo IgG1 de longitud completa.
8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, donde el anticuerpo comprende una porción Fc que comprende una sustitución N297A.
9. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1–8.
10. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9.
11. Un método para la producción de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$, que comprende el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 10, de modo de producir el anticuerpo.
12. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1–4 y un agente citotóxico.
13. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1–4 y un portador farmacéuticamente aceptable.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, que además comprende un antagonista de VEGF.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, donde el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.

16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, donde el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.
17. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1–4, que además comprende una marca detectable.
18. El anticuerpo de la reivindicación 16, donde la marca detectable es un miembro seleccionado del grupo que consiste en: un radioisótopo, un colorante fluorescente y una enzima.
19. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1–4, para el uso como un medicamento.
20. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1–4, para el uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno que involucra la anormal angiogénesis y/o pérdida o permeabilidad vascular.
21. El anticuerpo de la reivindicación 20, donde la enfermedad es un miembro seleccionado del grupo que consiste en: cáncer, enfermedades oculares y enfermedades autoinmunitarias.
22. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1–4, para el uso en la inhibición de la angiogénesis.
23. Un método para la detección de proteína $\alpha 5\beta 1$ en una muestra que se sospecha contiene la proteína $\alpha 5\beta 1$, donde el método comprende:
 - (a) el contacto del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 17–18, con la muestra; y
 - (b) la detección de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ y la proteína $\alpha 5\beta 1$.

24. El método de la reivindicación 19, donde la muestra es de un paciente diagnosticado con una enfermedad que involucra la anormal angiogénesis, la anormal permeabilidad vascular y/o pérdida vascular.
25. Un método para el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o un trastorno que involucra la anormal angiogénesis y/o pérdida o permeabilidad vascular, donde el método comprende la administración al individuo, de una cantidad eficaz de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
26. El método de la reivindicación 25, donde la enfermedad o el trastorno es un miembro seleccionado del grupo que consiste en: cáncer, una enfermedad ocular y una enfermedad autoinmunitaria.
27. El método de la reivindicación 26, donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de célula renal y glioblastoma.
28. El método de la reivindicación 25, donde la enfermedad o el trastorno es un miembro seleccionado del grupo que consiste en retinopatía, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización corneal, neovascularización de injerto corneal, neovascularización retiniana y glaucoma neovascular.
29. El método de la reivindicación 25, que además comprende la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de VEGF al individuo.
30. El método de la reivindicación 29, donde el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF.
31. El método de la reivindicación 30, donde el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

32. El método de la reivindicación 29, donde el antagonista de VEGF se administra antes del anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$.
33. El método de la reivindicación 29, donde el antagonista de VEGF y el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ se administran en forma simultánea.
34. El método de la reivindicación 29, donde el sujeto primero se trata con el antagonista de VEGF hasta que el sujeto ya no responde al tratamiento con el antagonista de VEGF, y luego se trata el sujeto con el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$.
35. El método de la reivindicación 29, que además comprende la administración de un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un agente antineoplásico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, y un agente citotóxico.
36. Un equipo para la detección de $\alpha 5\beta 1$ en un sujeto que se ha tratado con un antagonista de VEGF, donde dicho equipo comprende:
 - (a) un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ de cualquiera de las reivindicaciones 1-4; y
 - (b) instrucciones para el uso.

RESUMEN

La presente invención provee nuevos anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$, composiciones y equipos que comprenden los anticuerpos, y métodos para la preparación y el uso de los anticuerpos.

FIG. 1B

7 / 12

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	28	29	30	31	32	33	34	35	36
																												Kabati - CDR L1												
																												Chothia - CDR L1												
																												Contacto - CDR L1												
hum lambda III	-	S	E	L	F	Q	D	-	P	A	V	S	V	A	L	G	Q	F	V	R	I	T	C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Y	
Hämster 18C12	Q	F	V	L	F	Q	S	-	P	S	A	S	A	S	L	G	H	S	V	X	I	T	C	T	L	S	S	Q				H	S	F	Y	F	I	G	W	Y
h18C12.v1.1	D	I	V	L	T	Q	S	-	P	S	A	S	A	S	L	G	H	S	V	X	I	T	C	T	L	S	S	Q				H	S	F	Y	F	I	G	W	Y
h18C12.v3	E	F	V	L	T	Q	S	-	P	S	A	S	A	S	L	G	A	S	V	X	L	T	C	T	L	S	S	Q				H	S	F	Y	F	I	G	W	Y
h18C12.v6	E	F	V	L	T	Q	S	-	P	S	A	S	A	S	L	G	A	S	V	X	L	T	C	T	L	S	S	Q				H	S	F	Y	F	I	G	W	Y
h18C12.v6.1.Lam3	S	S	E	L	T	Q	D	-	P	A	V	S	V	A	L	G	Q	F	V	R	I	T	C	T	L	S	S	Q				H	S	F	Y	F	I	G	W	Y
h18C12.v6.2.Lam3	S	S	E	L	T	Q	D	-	P	A	V	S	V	A	L	G	Q	F	V	R	I	T	C	T	L	S	S	Q				H	S	F	Y	F	I	G	W	Y
h18C12.v6.1.5	S	S	E	L	T	Q	D	-	P	A	V	S	V	A	L	G	Q	F	V	R	I	T	C	T	L	S	S	Q				H	S	F	Y	F	I	G	W	Y

Kabat#	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	A	B	C	D	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72						
																	Kabat - CDR L2																Chothia - CDR L2													
																	Contacto - CDR L2																													
hum lambda III	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	H	P	A	S						
Hamster 18C12	Q	Q	H	P	D	X	A	P	K	Y	V	M	Y	L	N	S	D	G	S	K	N	K	G	D	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	A	H	R	Y						
h18C12.v1.1	Q	Q	H	P	D	X	A	P	K	Y	V	M	Y	L	N	S	D	G	S	K	N	K	G	D	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	A	H	R	Y						
h18C12.v3	Q	Q	Q	P	E	X	A	F	A	Y	L	M	Y	L	N	S	D	E	S	E	N	K	E	D	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	E	A	D	R	Y						
h18C12.v6	Q	Q	Q	P	E	X	A	P	A	Y	L	M	Y	L	N	S	D	E	S	E	N	K	G	D	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	A	D	R	Y						
h18C12.v6.1.Lam3	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	I	L	M	Y	L	N	S	S	E	S	K	N	K	G	S	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	G	A	T	R	S						
h18C12.v6.2.Lam3	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	L	N	S	S	G	S	K	N	K	G	S	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	E	A	T	R	S						
h18C12.v6.1.5	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	I	L	M	Y	L	N	S	D	S	S	E	N	K	G	S	G	I	P	D	R	F	S	G	S	S	S	E	A	T	R	S						

Kabat#	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	96	97	98	99	100	101	102
--------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	---	---	----	----	----	----	-----	-----	-----

																																Kabat - CDR L3								Chothia - CDR L3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
																																Contacto - CDR L3												SEC. ID. NRO.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
hum lambda III	L	F	I	T	G	A	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	I	X	X	X	X	X	I	X	I	X	F	G	G	G	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						</

SEC. ID. NRO.

FIG. 1B

2 / 12

P4170R1

Kabat#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	
	Kabat - CDR H2																																										
	Chothia - CDR H2																																										
	Contacto - CDR H2																																										
H�mster 18C12	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	X	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	K	S	L	Y	
hum VH III	P	G	K	G	L	E	W	V	S	X	I	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	R	F	T	I	S	R	D	K	S	K	K	T	L	Y	
h18C12.v3	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	X	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	K	T	L	Y	
h18C12.v6	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	X	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	K	T	L	Y	
h18C12.v6.1.Lam3	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	X	T	K	P	A	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	K	T	L	Y	
h18C12.v6.2.Lam3	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	X	T	K	P	A	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	K	T	L	Y	
h18C12.v6.1.5	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	X	T	K	P	A	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	K	T	L	Y	
Kabat#	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	101	102	103	104	105	106	107											
	Kabat - CDR H3																																										
	Chothia - CDR H3																																										
	Contacto - CDR H3																																										
H�mster 18C12	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	9									
hum VH III	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	10									
h18C12.v3	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	11									
h18C12.v6	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	12									
h18C12.v6.1.Lam3	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	13									
h18C12.v6.2.Lam3	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	13									
h18C12.v6.1.5	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	14									

4 / 12

P4T0R1

SEC. ID. NRO.

4 / 12

P4170R1

SEC. ID. NRO.

FIG. 2B



Clon	CDR-L1												CDR-L2												CDR-L3											
	24	25	26	27	A	28	29	30	31	32	33	34	50	A	B	C	D	51	52	53	54	55	56	89	90	91	92	93	94	95	96	97				
h18C12.v3	F	L	S	S	Q	H	S	T	T	T	I	E	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	T	S	S	G	T	V	29	
h18C12.v6	F	L	S	S	Q	H	S	T	T	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	A	A	T	T	A	T	G	T	V	30	
h18C12.v7	F	L	S	S	Q	H	S	T	T	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	T	S	T	T	S	G	T	V	31	
h18C12.v9	F	L	S	S	Q	H	S	T	T	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	T	S	T	G	T	V	32	
h18C12.v15	F	L	S	P	Q	H	F	T	T	K	I	D	22	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	T	S	S	G	T	V	29	
h18C12.v16	F	L	S	S	N	K	S	I	T	T	I	S	23	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	T	S	S	G	T	V	29	
h18C12.v28	F	L	S	S	Q	H	S	T	T	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	A	S	T	S	S	G	T	I	33	
h18C12.v30	F	L	T	T	Q	H	S	T	T	T	I	G	24	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	T	S	S	G	T	V	29	
h18C12.v51	F	L	S	S	Q	H	S	T	T	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	T	S	S	G	T	V	29	
h18C12.v54	F	L	S	S	Q	H	S	T	T	T	I	G	21	I	N	S	D	G	S	H	X	K	G	V	26	G	S	S	T	S	S	G	T	V	29	
h18C12.v70	F	L	S	S	Q	H	S	T	T	T	I	G	21	L	T	S	H	G	L	N	Q	K	G	V	27	G	S	S	T	S	S	G	T	V	29	
h18C12.v78	F	L	S	S	Q	H	S	T	T	T	I	G	21	L	N	S	D	S	T	T	I	T	A	V	28	G	S	S	T	S	S	G	T	V	29	

FIG. 3

Clon	CDR-H1										CDR-H2															CDR-H3															
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	95	96	97	98	99	100	A	101	102			
h18C12.v3	G	F	T	F	S	N	R	N	I	T	34	G	I	K	T	K	F	N	I	T	A	T	E	T	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	T	F	D	T	38
h18C12.v6	G	F	T	F	S	N	R	N	I	T	34	G	I	K	T	K	P	N	I	T	A	T	E	T	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	K	T	F	D	T	39
h18C12.v7	G	F	T	F	S	N	R	N	I	T	34	G	I	K	T	K	P	N	I	T	A	T	E	T	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	T	F	D	T	38
h18C12.v9	G	F	T	F	S	N	R	N	I	T	34	G	I	K	T	K	P	N	I	T	A	T	E	T	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	T	F	D	T	38
h18C12.v15	G	F	T	F	S	N	R	N	I	T	34	G	I	K	T	K	P	N	I	T	A	T	E	T	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	T	F	D	T	38
h18C12.v16	G	F	T	F	S	N	R	N	I	T	34	G	I	K	T	K	P	N	I	T	A	T	E	T	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	T	F	D	T	38
h18C12.v28	G	F	T	F	S	N	R	N	I	T	34	G	I	K	T	K	P	N	I	T	A	T	E	T	A	D	S	V	K	G	36	V	T	G	M	R	T	F	D	T	40
h18C12.v30	G	F	T	F	S	N	R	N	I	T	34	G	I	K	T	K	P	N	I	T	A	T	E	T	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	T	F	D	T	38
h18C12.v51	G	F	T	F	S	N	R	N	V	T	35	G	I	K	T	K	P	T	R	T	A	T	Q	T	A	D	S	V	K	G	37	L	T	G	M	R	T	F	D	T	38
h18C12.v54	G	F	T	F	S	N	R	N	I	T	34	G	I	K	T	K	P	N	I	T	A	T	E	T	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	T	F	D	T	38
h18C12.v70	G	F	T	F	S	N	R	N	I	T	34	G	I	K	T	K	P	N	I	T	A	T	E	T	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	T	F	D	T	38
h18C12.v78	G	F	T	F	S	N	R	N	I	T	34	G	I	K	T	K	P	N	I	T	A	T	E	T	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	T	F	D	T	38

5 / 12

P4170R1

P4170R1

6 / 12

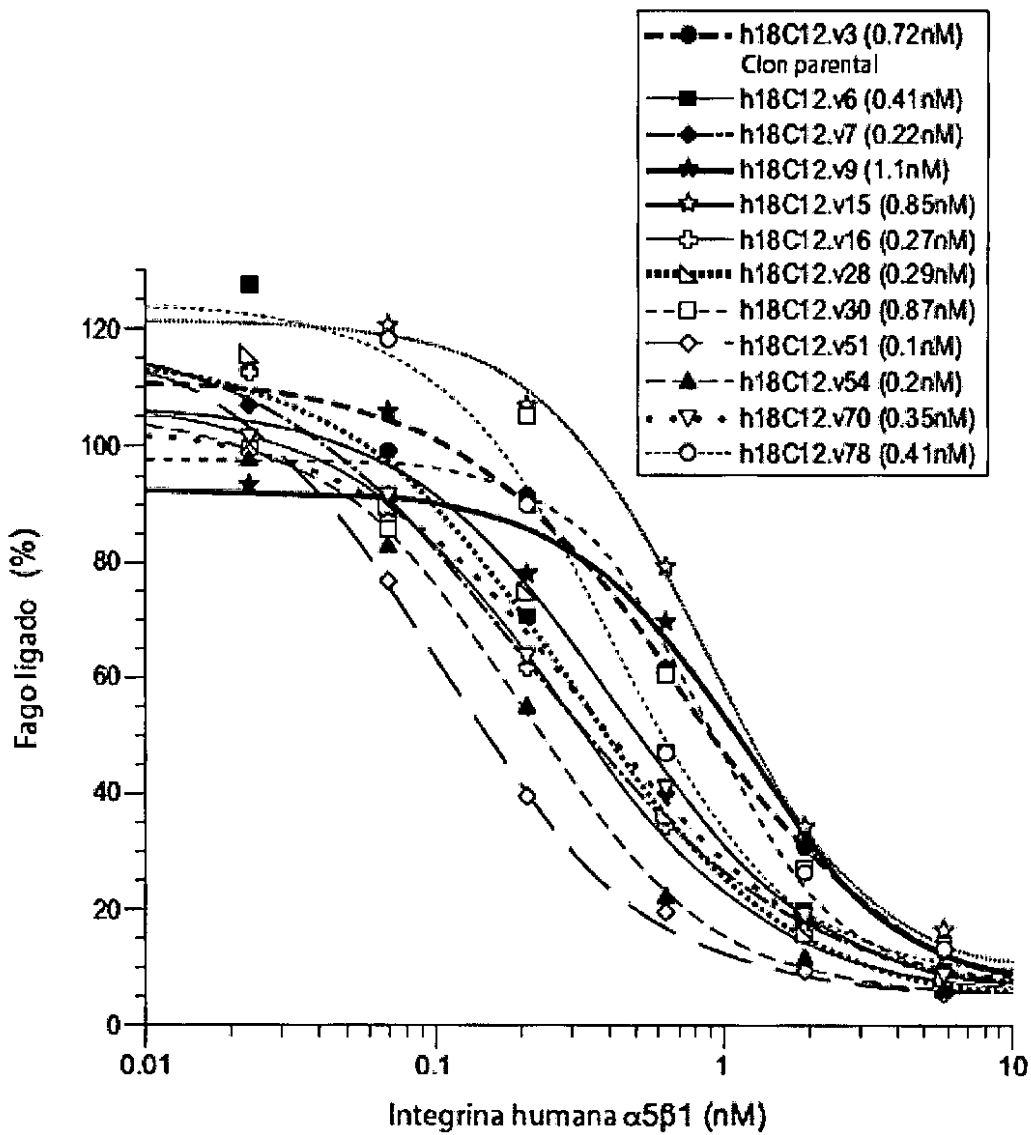


FIG. 4

P4170R1

7 / 12

Anti-α5β1 hlgG Análisis BIAcore (Ligando: hlgG; Analito: α5β1)			
Anti-α5β1	Integrina humana α5β1 (R&D)		
	kon(10 ⁵ M ⁻¹ S ⁻¹)	koff(10 ⁻⁴ S ⁻¹)	Kd(nM)
h18C12.v3	0.71 ± 0.08	8.07 ± 0.37	11.5 ± 1.1
h18C12.v6	1.74 ± 0.51	7.50 ± 1.64	4.8 ± 2.1
h18C12.v15	2.23 ± 0.09	15.2 ± 0.5	6.9 ± 0.3
h18C12.v54	0.63 ± 0.11	7.34 ± 0.32	11.9 ± 2.4
h18C12.v70	0.66 ± 0.19	12.8 ± 0.8	20.3 ± 3.8

FIG. 5

Anti-α5β1 hlgG Resumen BIAcore (Ligando: hlgG; Analito: α5β1)			
Anticuerpo	Integrina humana α5β1 (R&D)		
	kon(10 ⁵ M ⁻¹ S ⁻¹)	koff(10 ⁻⁴ S ⁻¹)	Kd(nM)
h18C12.v6.1.Lam3	0.97 ± 0.03	3.86 ± 0.24	4.00 ± 0.32
18C12 quimérico	1.2 ± 0.1	9.22 ± 0.19	7.68 ± 0.53

FIG. 6

Anti-α5β1 h18C12.v6.1 Variantes	CDR-L2				Integrina humana α5β1 (R&D)		
	50a	50b	50c	50d	kon(10 ⁵ M ⁻¹ S ⁻¹)	koff(10 ⁻⁴ S ⁻¹)	Kd(nM)
h18C12.v6.1.1	S	S	S	G	1.2	32	26.7
h18C12.v6.1.2	N	S	D	G	0.48	6.43	13.5
h18C12.v6.1.3	N	S	A	G	1.1	40	36.4
h18C12.v6.1.4	N	S	D	A	0.46	14.4	31.6
h18C12.v6.1.5	N	S	D	S	0.43	6.59	15.5

FIG. 7

P4170R1

8 / 12

Unión de células U937 a fibronectina

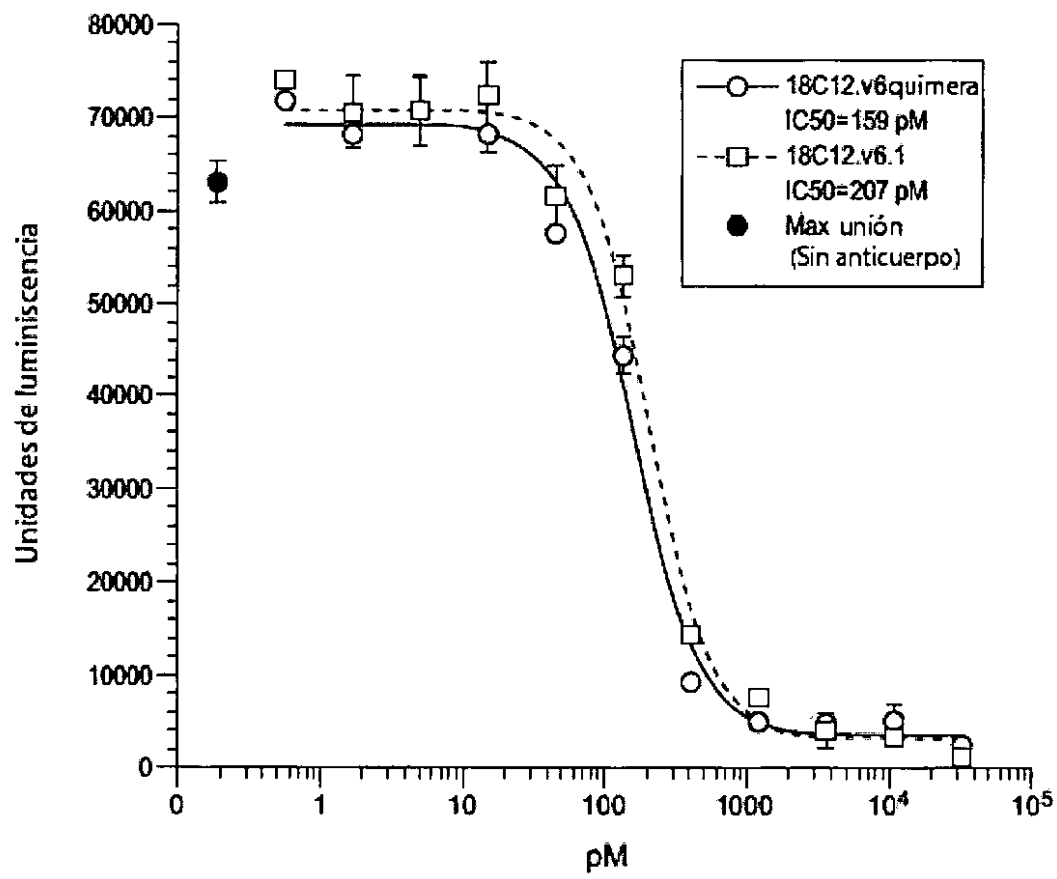


FIG. 8

P4170R1

9 / 12

Unión de células U937 a fibronectina

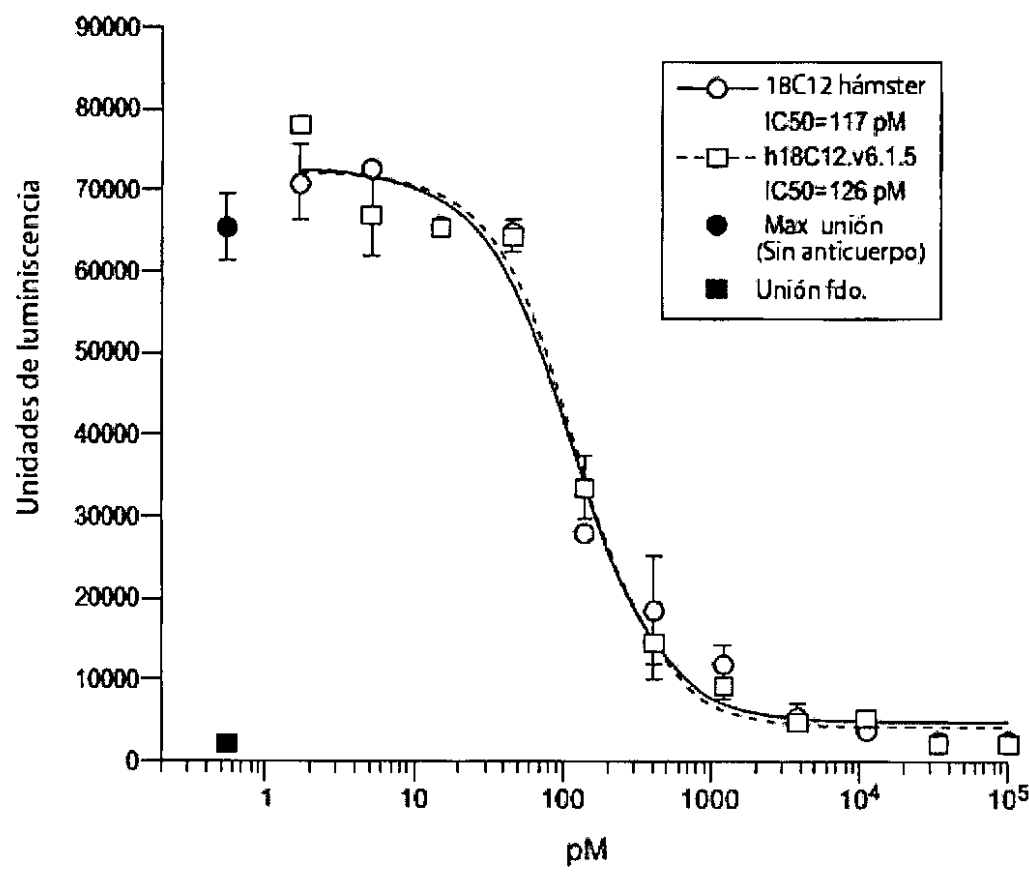


FIG. 9

P4170R1

10 / 12

Unión $\alpha 5 \beta 1$ a fibronectina

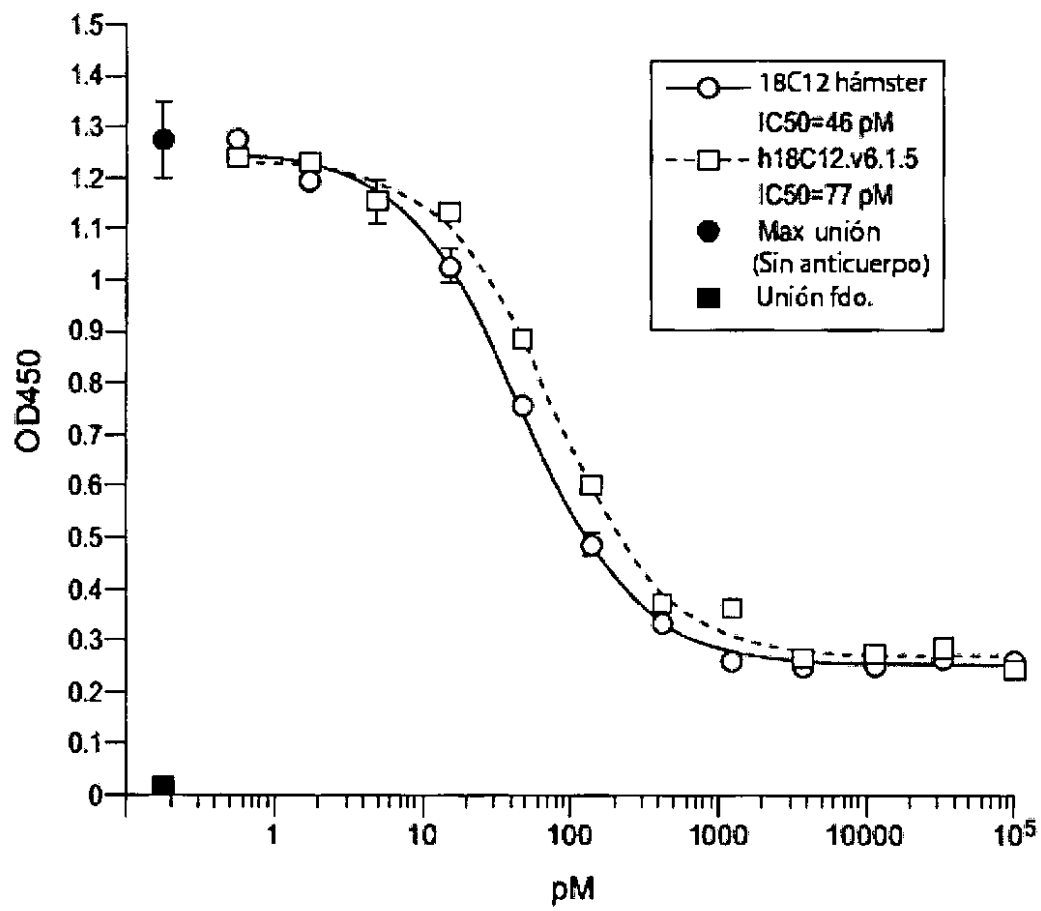


FIG. 10

P4170R1

11 / 12

Migración HUVEC a fibronectina
en presencia de anticuerpos

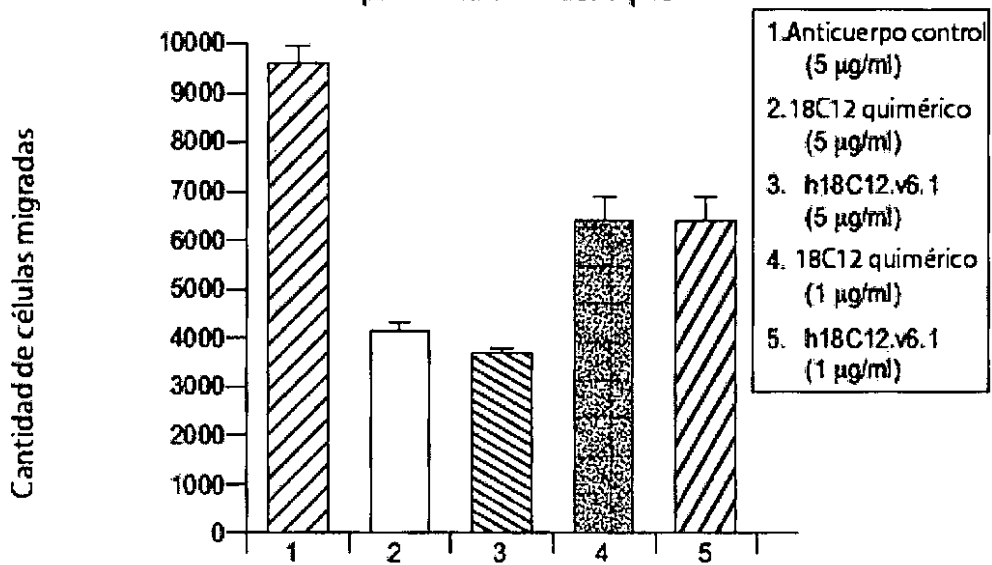


FIG. 11

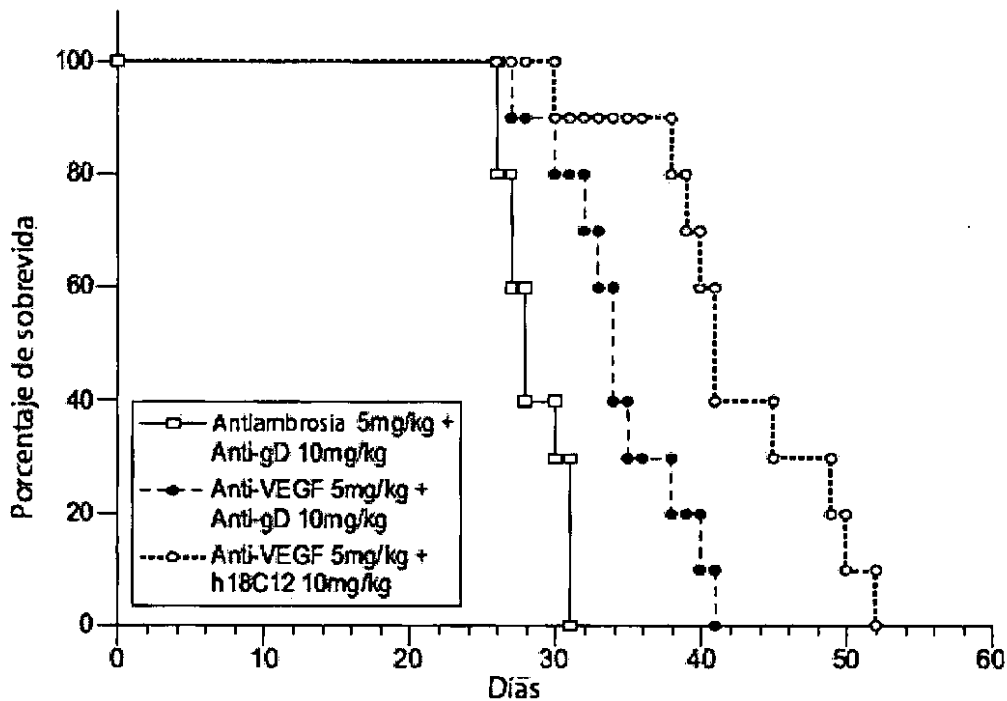


FIG. 12

P4170R1

12 / 12

Media bioluminiscencia tumoral

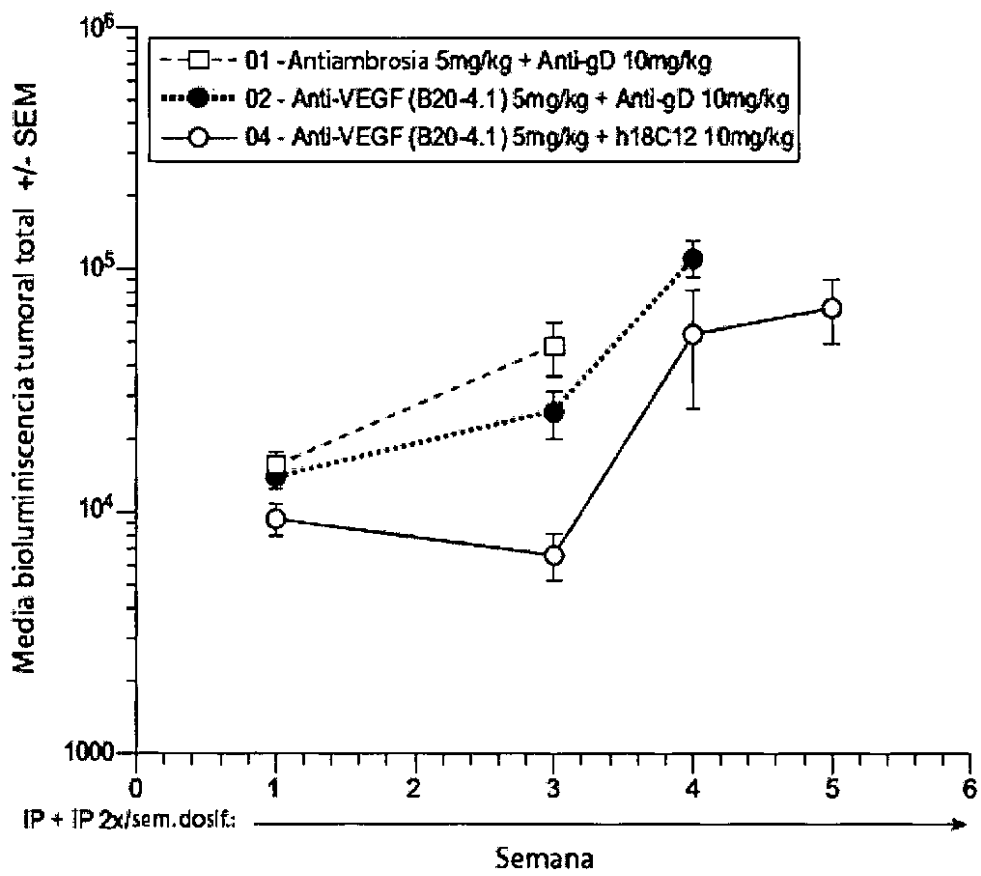


FIG. 13

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros)

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciled in South San Francisco, California 94080-4990
USA

domiciliado(s) en

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

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

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

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

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

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

Otorgado y firmado en

South San Francisco, California, USA

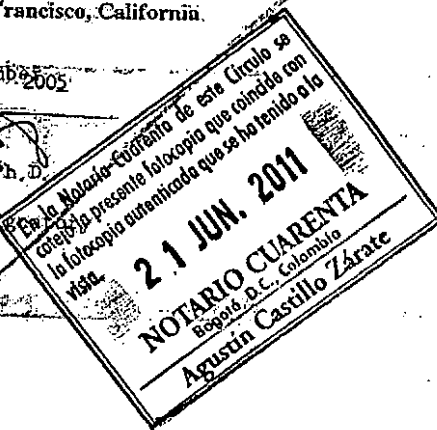
hoy de de 200

Given and signed in day of December 2005

Firma

Signature: 
Name: R. Schwartz, Ph.D.
Title: Senior Patent Counsel
Company: Genentech, Inc.

Nombre:
Cargo:



AUTHORIZATION

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

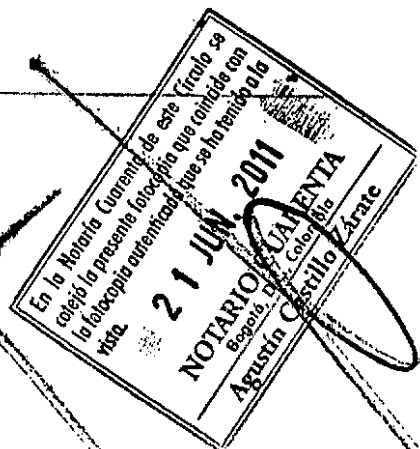
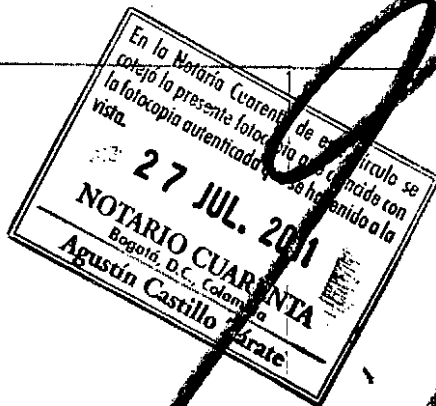
August 27, 2002

Dated

Sean Johnston

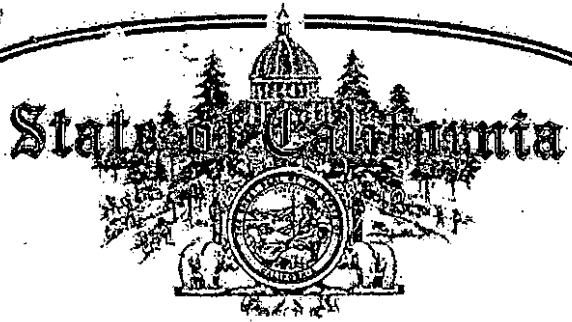
Sean A. Johnston

Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.



100-100-100

P: 77000



SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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

CERTIFIED

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

10. Signature.



[Signature]
Secretary of State

NR-247 (REV. 4-05)

BY

OSP-05-00772

En la Notaria Cuarenta de este Circulo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
27 JUL. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaria Cuarenta de este Circulo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
21 JUN. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of San Mateo } ss.

On December 6, 2005 before me, Aida Mielat Guzman

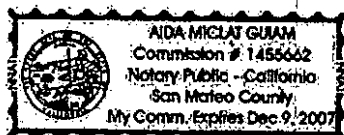
personally appeared Timothy R. Schwartz

Name and Title of Officer (e.g., Notary Public)

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.



WITNESS my hand and official seal.

Aida Mielat Guzman
Signature of Notary Public

OPTIONAL

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

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____ Number of Pages: _____

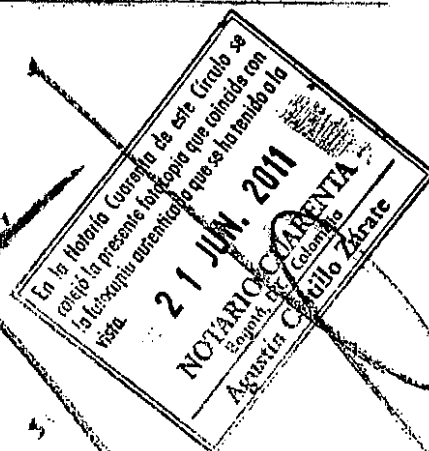
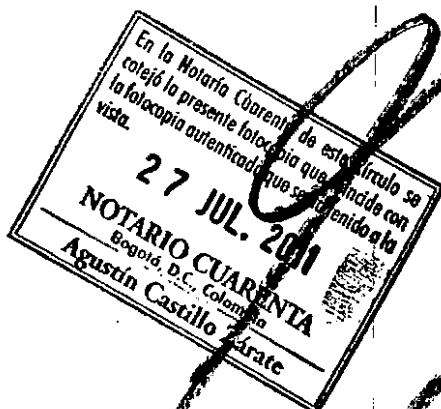
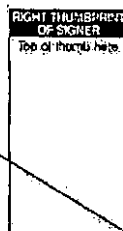
Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

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

Signer is Representing: _____



93 33

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

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA

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

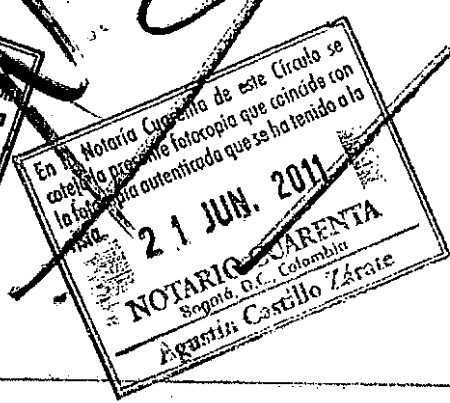
1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público
Estado de California

CERTIFICADO

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

10. Firma

(Firma)
Secretario de Estado



RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

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

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

☐ a quien conozco personalmente

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

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISION # 14556812
Notario Público-California
Condado de San Mateo
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

OPCIONAL

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede
prevenir la remoción y reedición fraudulenta de esta firma o otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento:

Fecha del Documento:

Número de páginas:

Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba:

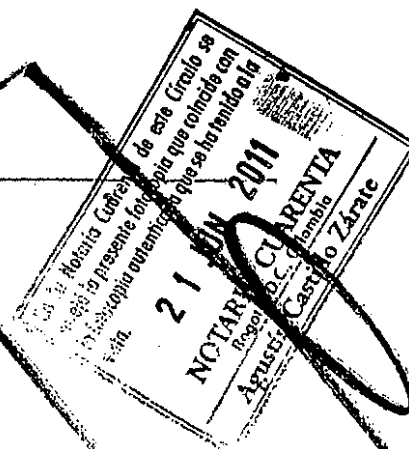
Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante:

- ☐ Individuo
☐ Funcionario Corporativo - Título(s):
☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de hecho
☐ Fidelcomisario
☐ Guardián o conservador
☐ Otro:

Huella índice
derecho del firmante
Parte alta del dedo equi

El firmante representa:



AUTORIZACION

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

27 de Agosto de 2002

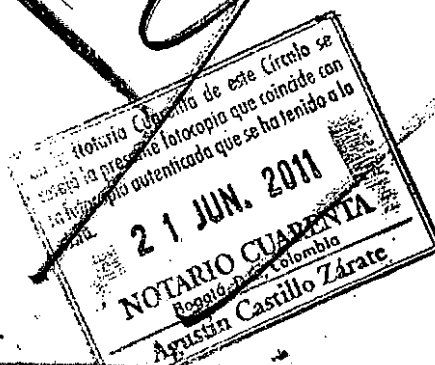
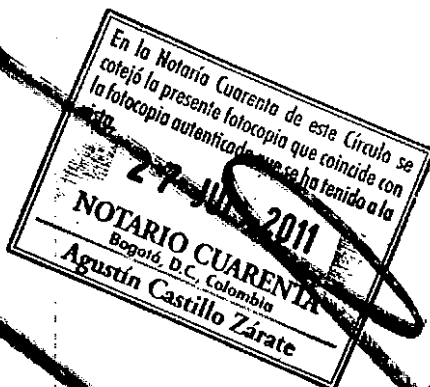
Fechado

(Firma)

Sean A. Johnston

Vicepresidente, Propiedad Intelectual

Genentech, Inc.



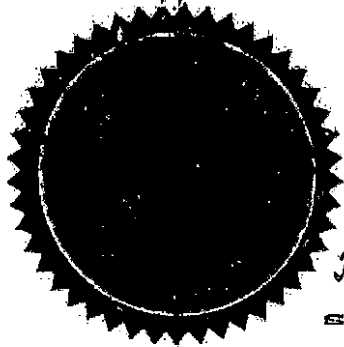
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

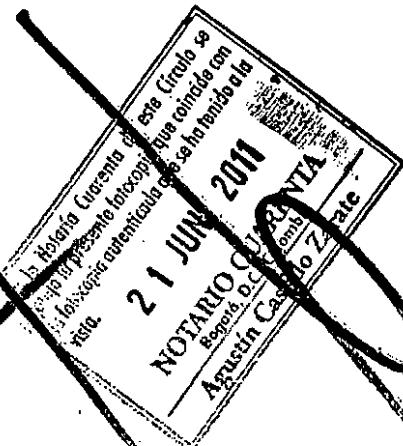
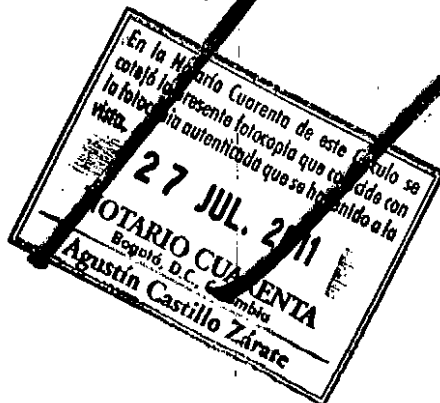
1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254030
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State

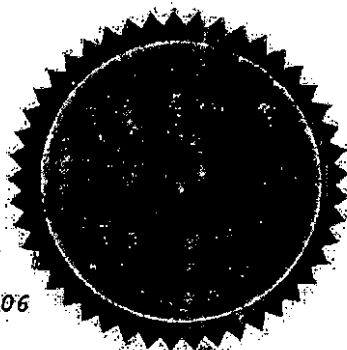


Delaware

PAGE 1

The First State

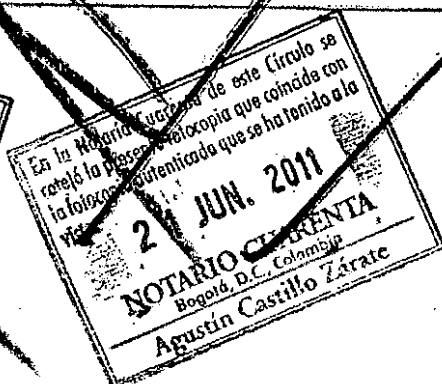
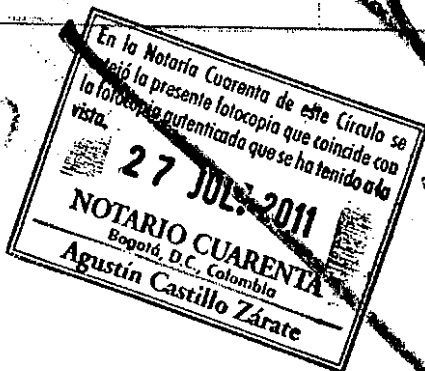
I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.



2112549
050426506

Harriet Smith Windsor
Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION 3900384

DATE: 05-24-05



AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

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

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

ARTICLE I

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

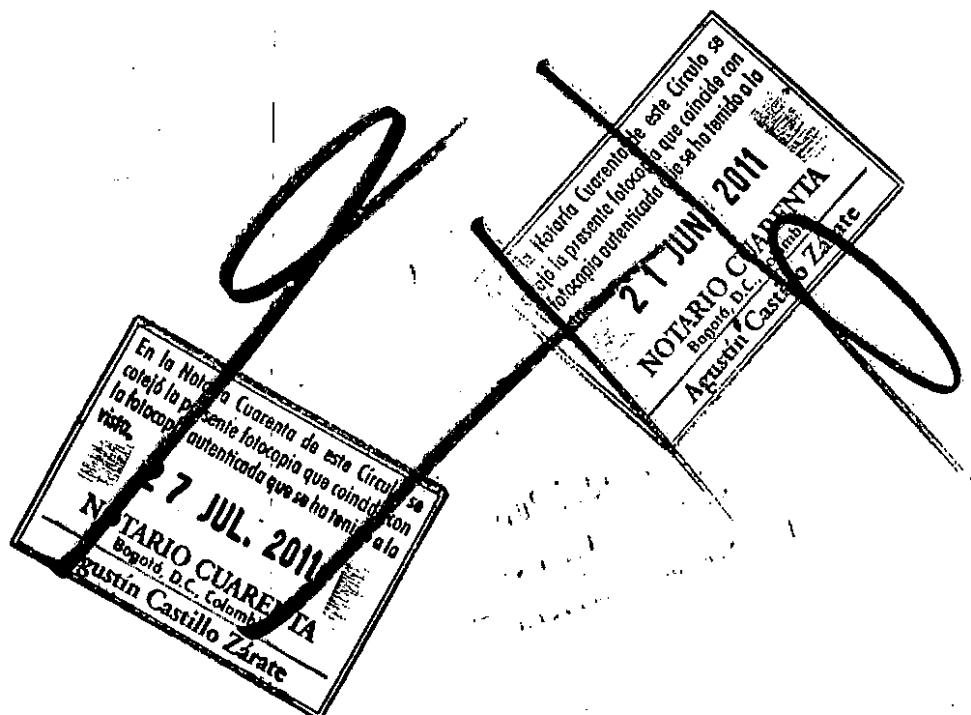
ARTICLE 2

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

ARTICLE 3

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

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



ARTICLE 4

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

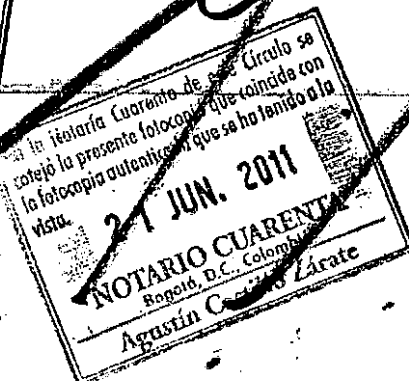
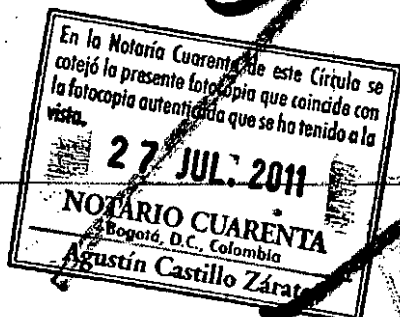
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the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

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

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

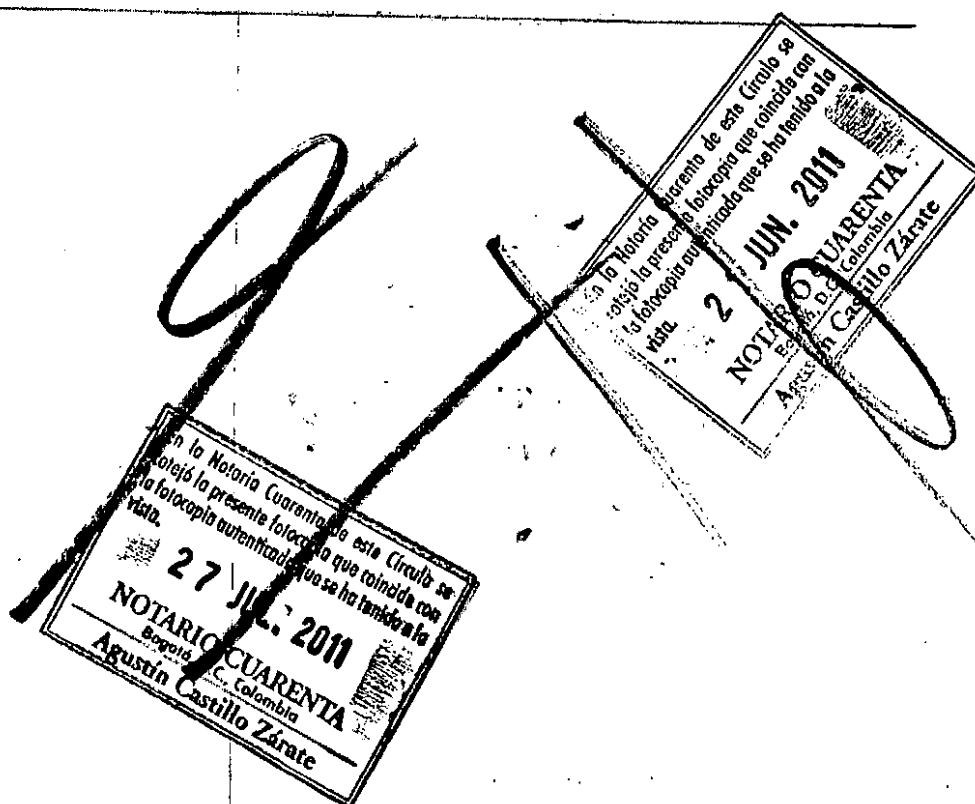
SECTION 4.03. Preferred Stock.

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



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

- (i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;
- (ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;
- (iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;
- (iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;
- (v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;
- (vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;
- (vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and
- (viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.



ARTICLE 5

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

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

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

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

ARTICLE 6

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

En la Notaria Cuarenta de este Circulo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
27 JUL. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustin Castillo Zarate

En la Notaria Cuarenta de este Circulo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
21 JUN. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustin Castillo Zarate

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

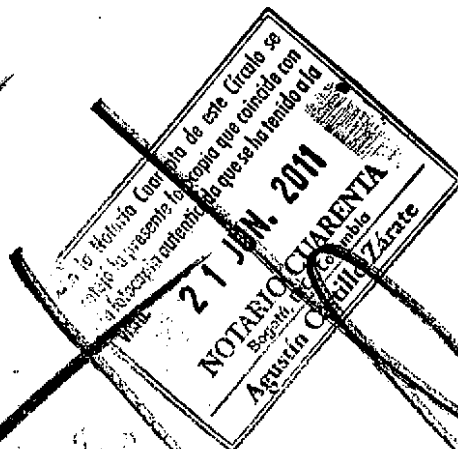
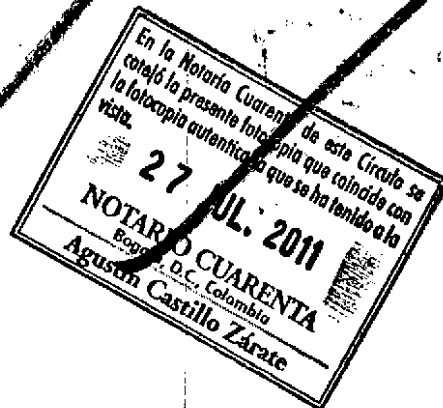
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

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

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

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

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



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

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

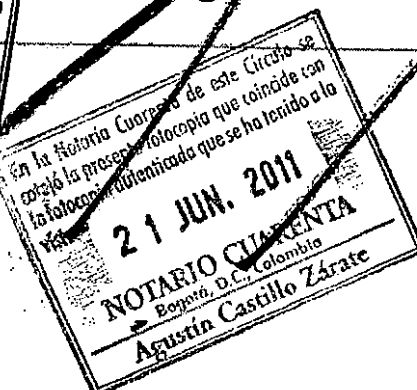
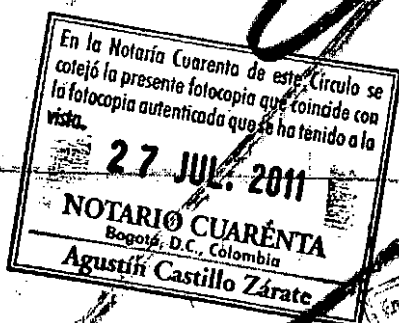
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect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

ARTICLE 7

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

ARTICLE 8

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



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

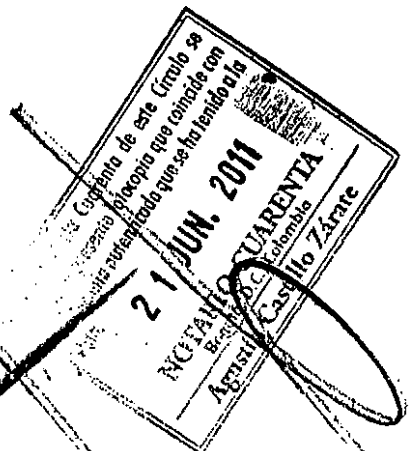
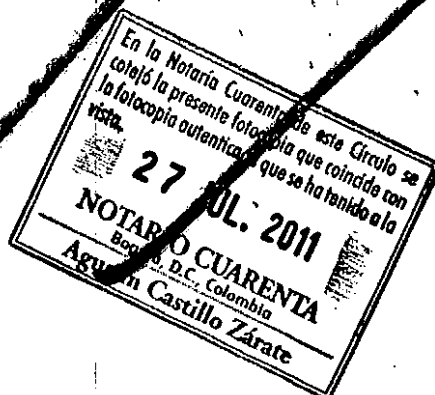
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

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

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

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

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



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

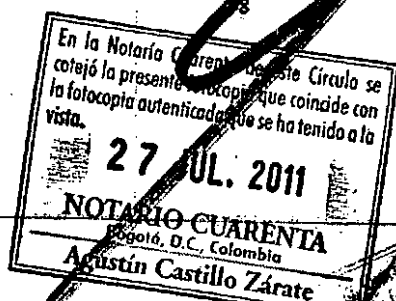
SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or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

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

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

ARTICLE 9

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



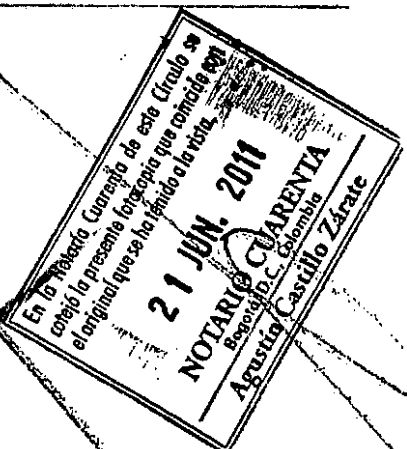
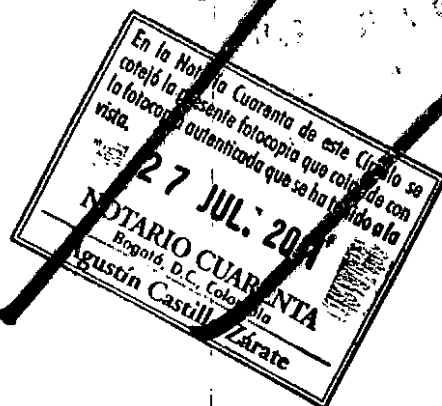
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment,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

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

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

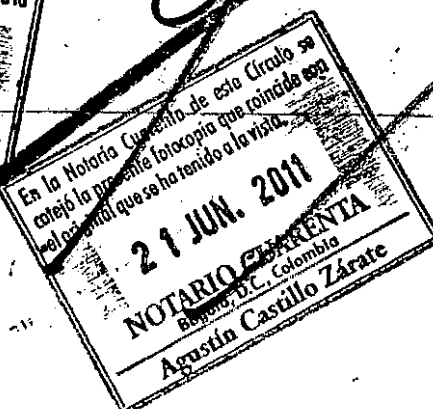
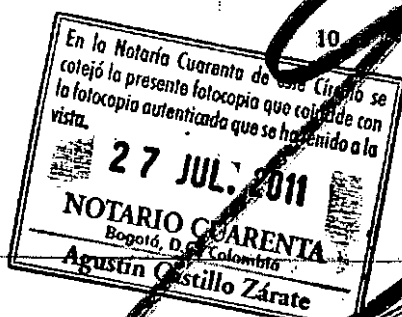
SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

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



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

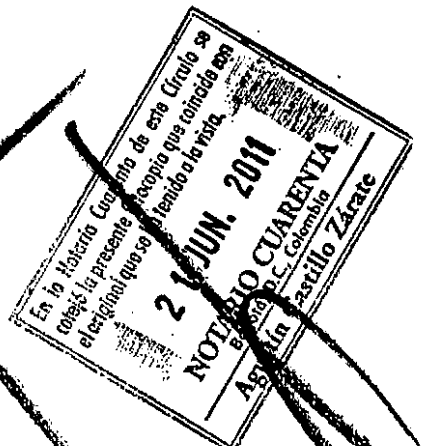
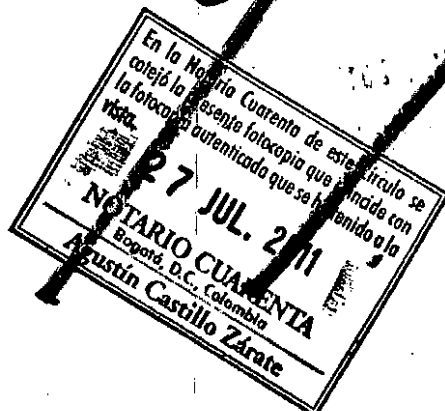
SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.



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

GENENTECH, INC.

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



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

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

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

Certificado

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

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

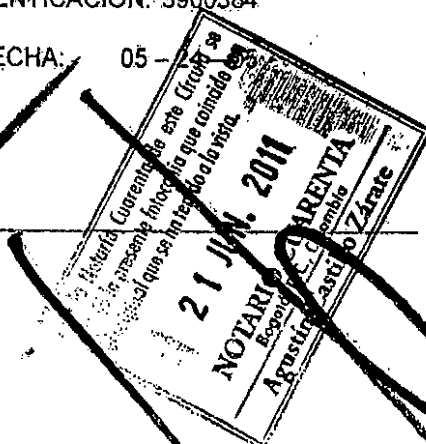
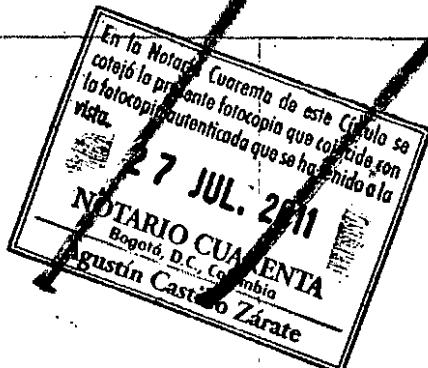


DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

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

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

FECHA: 05 -



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

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

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

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

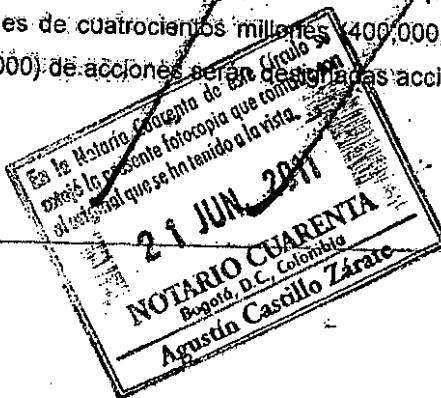
La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

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

ARTICULO 4

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



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

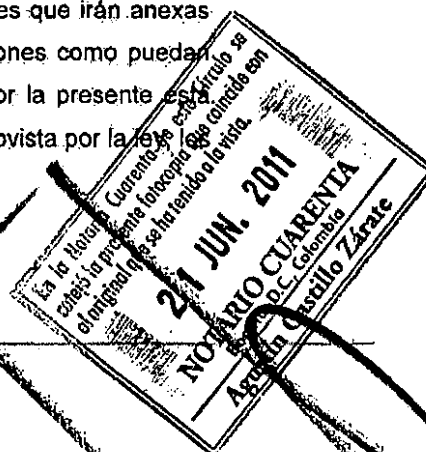
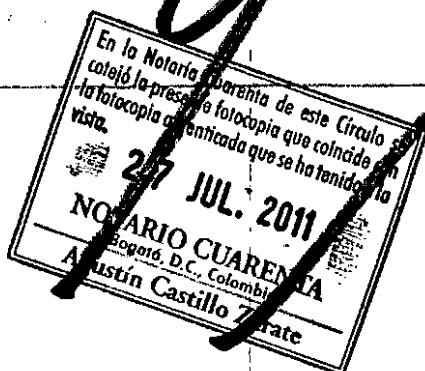
(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de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

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

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

SECCIÓN 4.03. Acción Preferencial

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



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

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

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

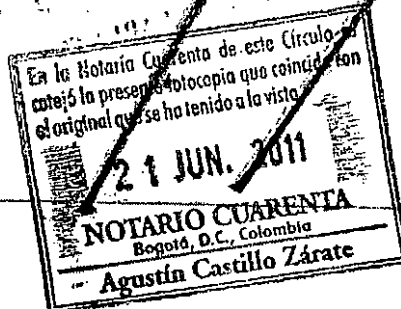
(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

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

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

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

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



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

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

ARTICULO 5

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

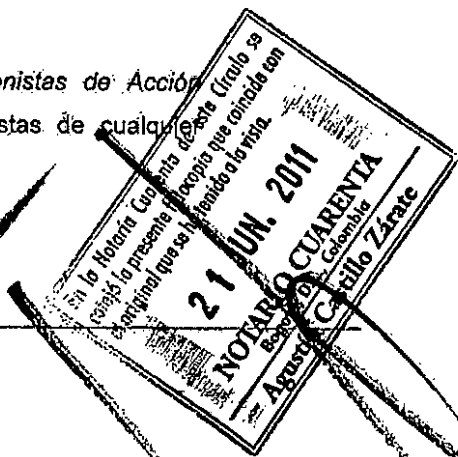
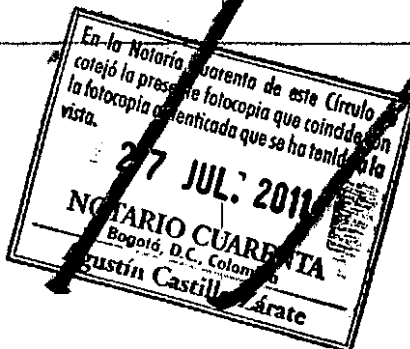
(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

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

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

ARTICULO 6

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

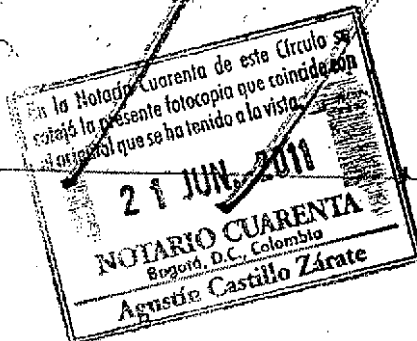
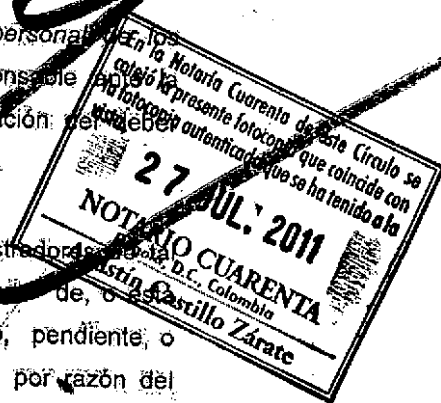


acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i)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

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

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

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



1

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

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

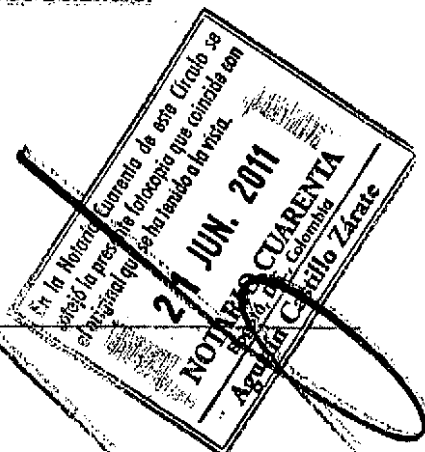
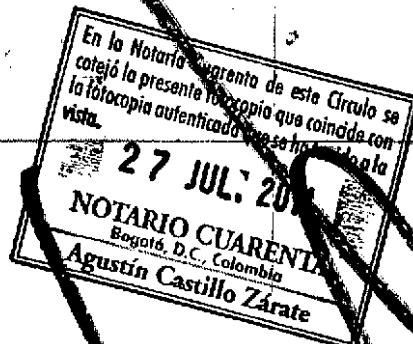
(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad,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

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

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

ARTICULO 7

SECCION 7.01, Sección 203 de la Ley de Delaware. Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.



ARTICULO 8

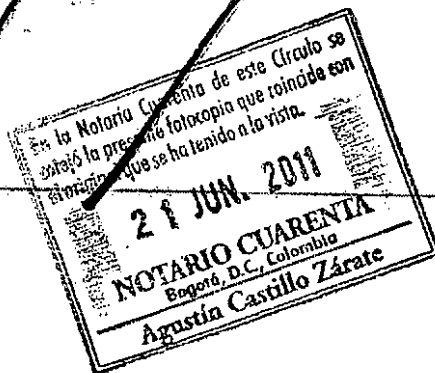
SECCIÓN 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser una subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes, en cualquier situación particular, las condiciones de este artículo 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCIÓN 8.02. *Actividades en Negocios Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito,

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o líneas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o director de la misma será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche o de la participación de la persona en las mismas.

En el evento que Roche adquiera conocimientos de una oportunidad o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hecho

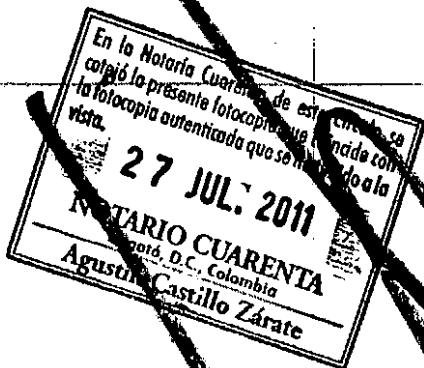


que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 8.

SECCION 8.05. *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 8 y el Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término "**Roche**" debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación) definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son "**afiliadas**" (como se



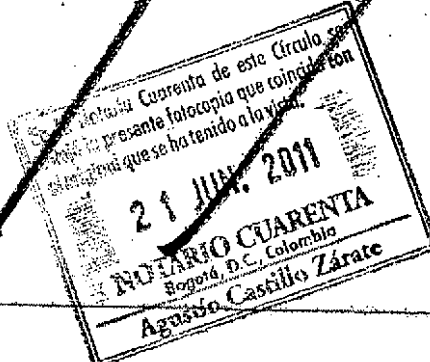
define, en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante*. Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9*. Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos*. Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo o anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquier tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "*Corporación*" y "*Roche*" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

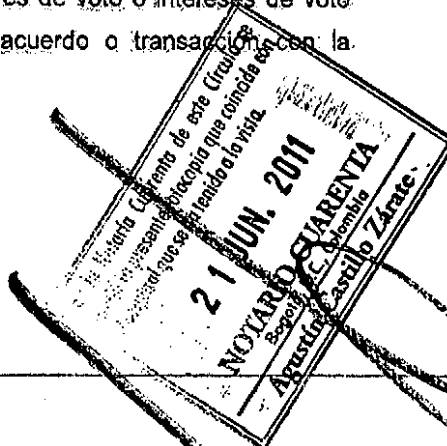
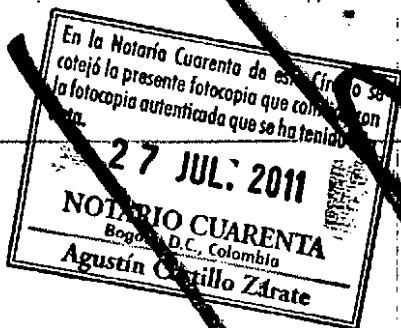


SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo). Las acciones vigentes de las Acciones Comunes de propiedad de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de accionistas que autorice o apruebe tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo).

SECCION 9.03. *No responsabilidad por acciones de buena fe.* Ni Roche ni ningún funcionario o director de la misma será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar cualquiera de los deberes fiduciarios o deberes de lealtad o por fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o por derivación de cualquier beneficio personal por razón del hecho que Roche o un funcionario o director de la misma de buena fe tome cualquier acción o ejerza cualquier derecho o de o retenga cualquier consentimiento en conexión con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto dado u otra acción tomada por cualquier persona que es un funcionario, director o representante de Roche, donde el voto o acción es tomado por tal persona en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho o un consentimiento de Roche para los propósitos de cualquiera de tal acuerdo o contrato.

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 9.

SECCION 9.05. *Contratos cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato, acuerdo o transacción con la Corporación.



SECCION 9.06. *Efecto obligante.* Ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 9 ni la adopción de alguna condición inconsistente con cualquier condición de este Artículo 9 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 respecto a cualquier materia que ocurra, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, a no ser por este Artículo 9, pueda acaecer o surgir, antes de tal alteración, enmienda, cambio, rechazo o adopción.

SECCION 9.07. *Artículo 8.* Las condiciones de este Artículo 9 son adicionales a las condiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, el cual ha sido adoptado de acuerdo con las secciones 242 y 245 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware y por consentimiento escrito de el único accionista de la Corporación de acuerdo con la sección 228 de Ley General de Corporación del Estado de Delaware, ha sido ejecutado este 22 de Julio de 1999.

GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría



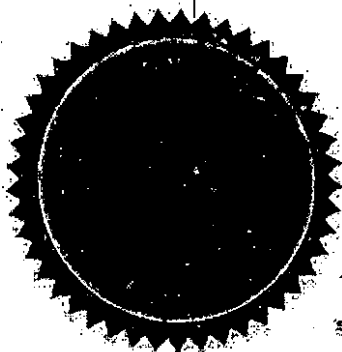
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

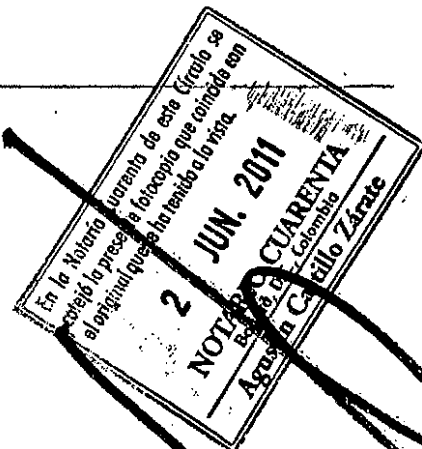
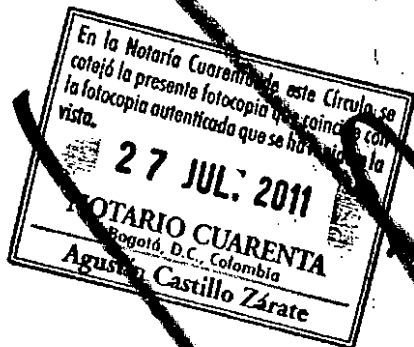
1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254031
9. Seal/Stamp:
10. Signaturé:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

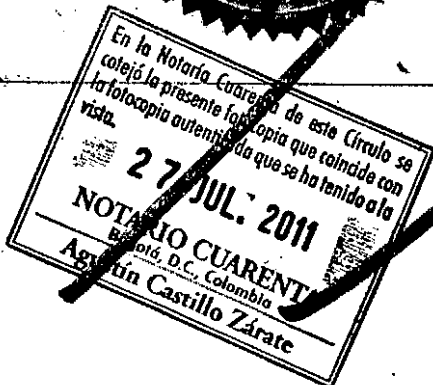
I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.

2112549

050426506

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 7980385

DATE: 05-24-05



CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

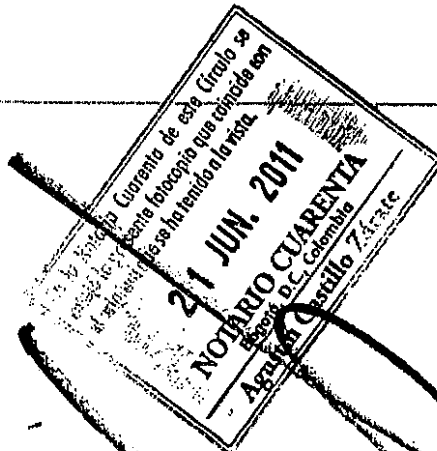
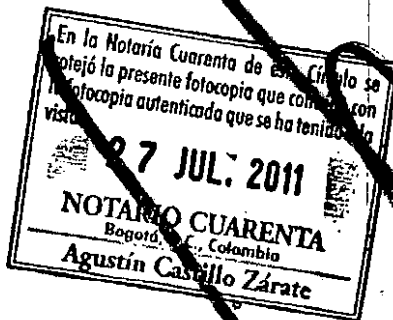
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

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

35841



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

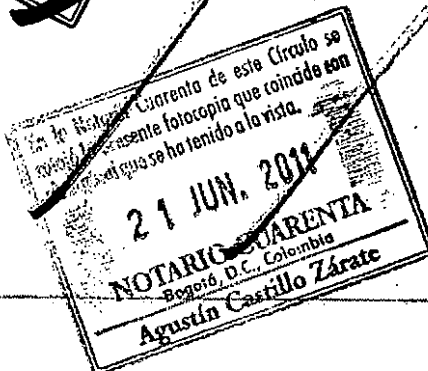
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

Certificado

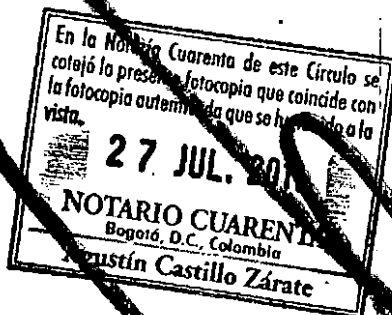
5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254031
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

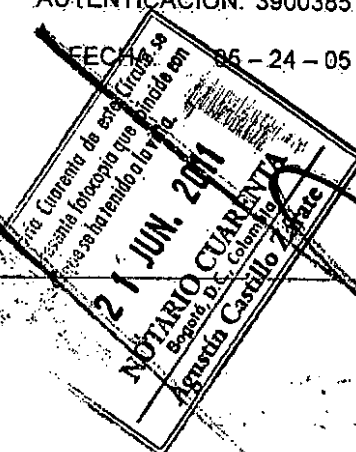


DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL
ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES
UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A
REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL
DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000, A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385



CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

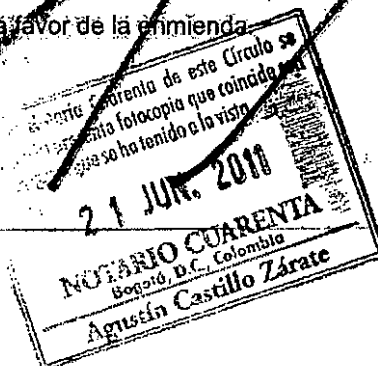
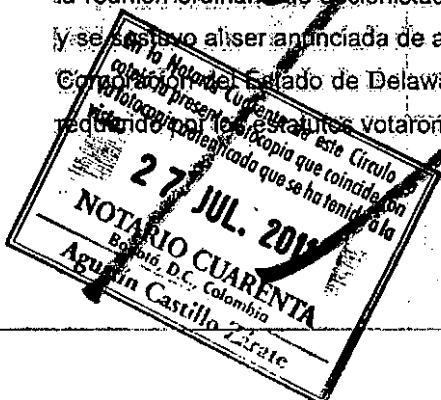
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital*, (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación está autorizada a emitir es de seiscientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido para la validación de la enmienda votaron a favor de la enmienda.



TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

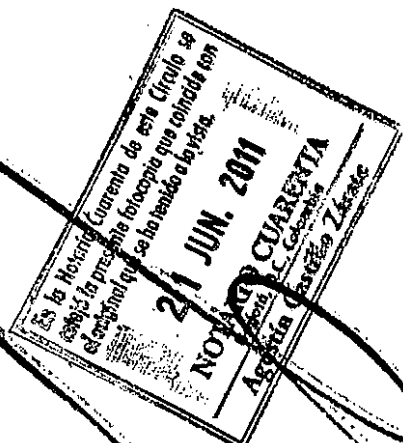
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General



3/4

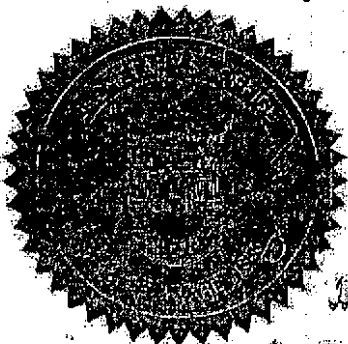
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

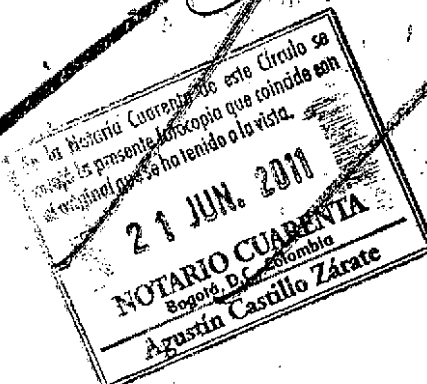
1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

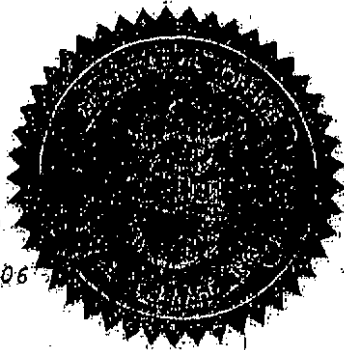
5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254033
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



L. HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.

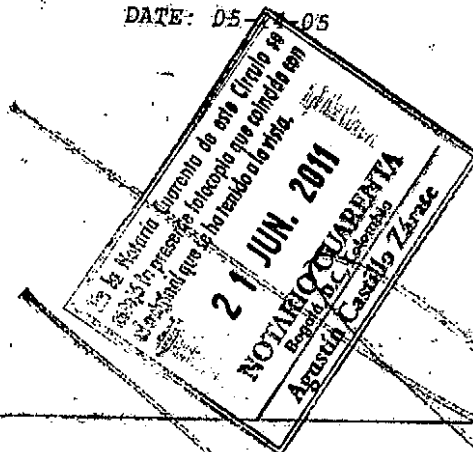
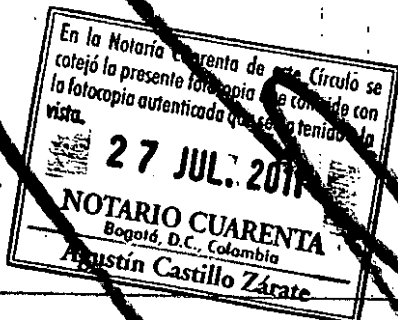


Harriet Smith Windsor
Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

2112549

050426506

DATE: 05-05-05



State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
SERV. 040281669 - 2112549 FILE

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

Section 4.01. Capital Stock. (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Executive Vice President, General Counsel
and Secretary

#153087

En la Notaria Cuarenta de este Circulo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autentica que se ha tenido a la
vista.
27 JUL 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaria Cuarenta de este Circulo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autentica que se ha tenido a la vista.
21 JUN 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

APOSTILLA

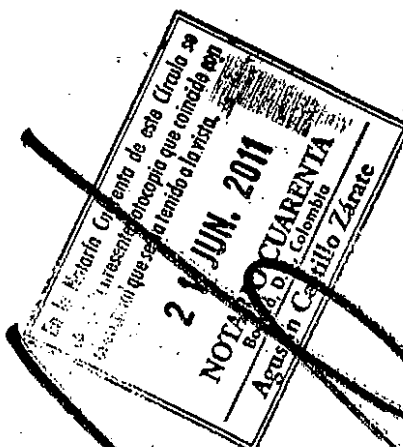
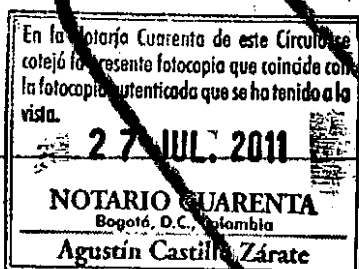
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

Certificado

6. en Dover, Delaware
7. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
8. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
9. No. 0264033
10. Sello/timbre
11. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL
ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES
UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE
"GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA
DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.

En la Notaría Cuarenta de este Circulo se
cotejó la presente fotocopia de la cual se
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
27 JUL 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

En la Notaría Cuarenta de este Circulo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.
21 JUN 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

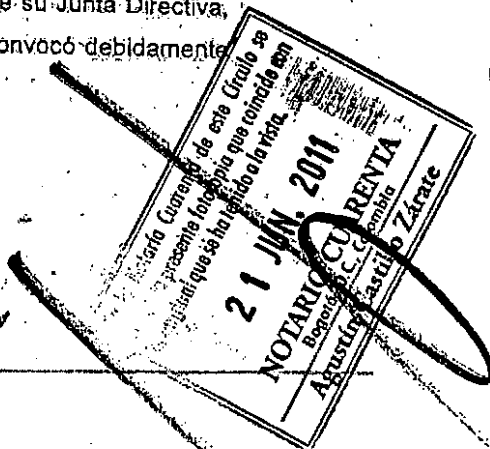
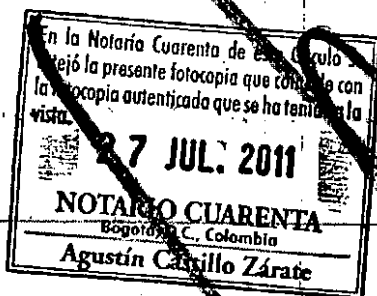
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación está autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente.



TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda.

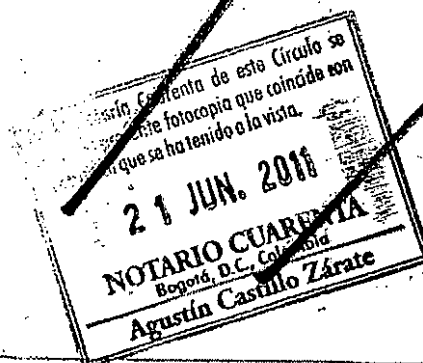
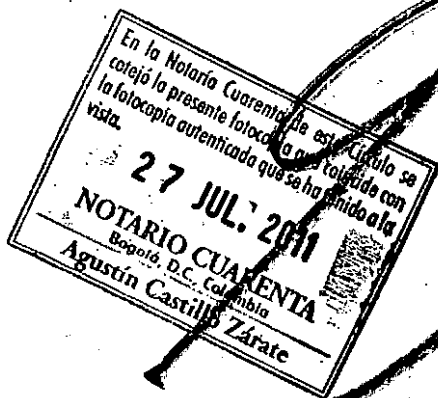
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



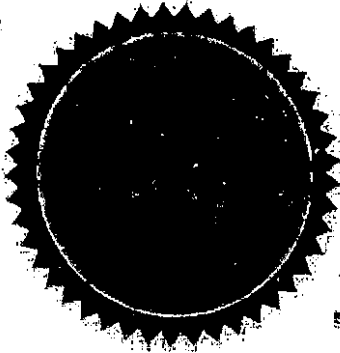
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

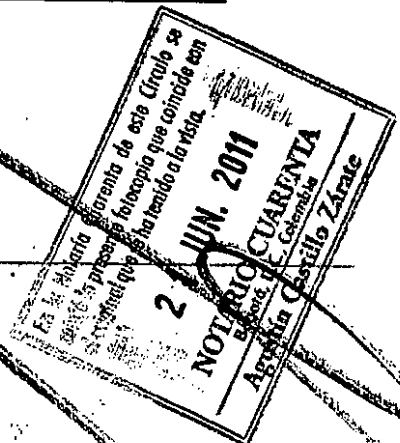
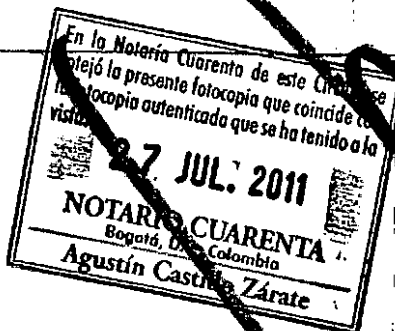
1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254032
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

HARRIET SMITH WINDSOR, Secretary of State
AUTHENTICATION: 8900386

DATE: 05-24-05



CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. Capital Stock. (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

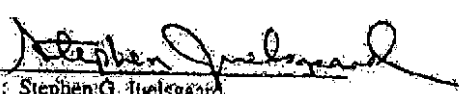
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said Corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

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

20747

En la Notaría Cuarenta de este Circulo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
27 JUN 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaría Cuarenta de este Circulo se
presentó fotocopia que coincide con
la que se ha tenido a la vista.
21 JUN 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

TRADUCCION AL ESPANOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

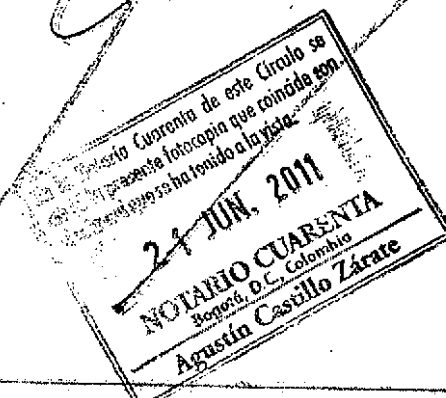
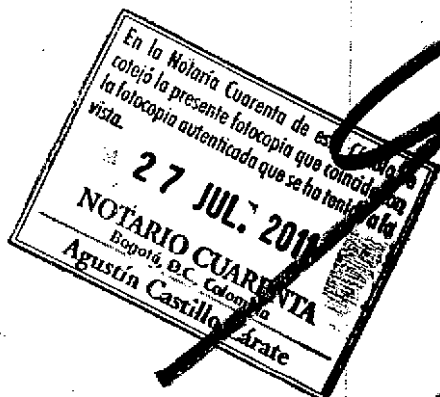
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

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

Certificado

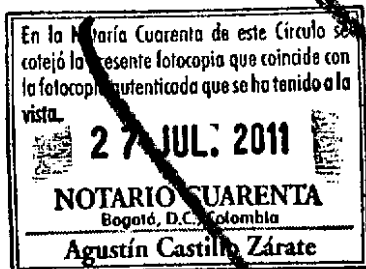
5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No: 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



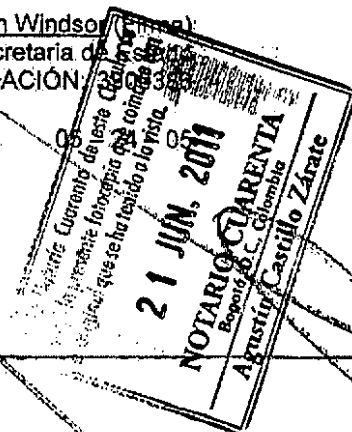
DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL
ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES
UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE
"GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE
MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN:

FECHA:



CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

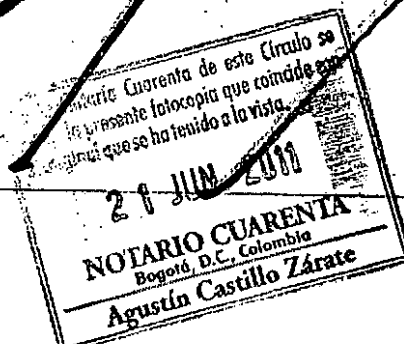
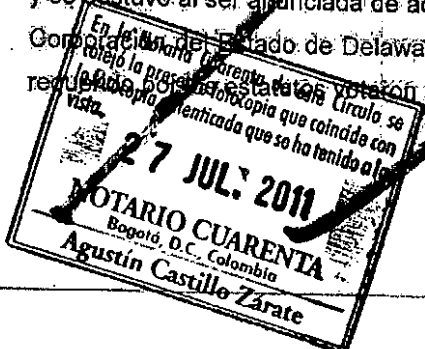
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmiende cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación está autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido para esta reunión a favor de la enmienda.



TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda.

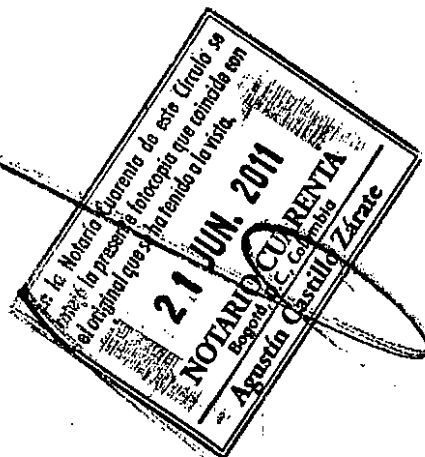
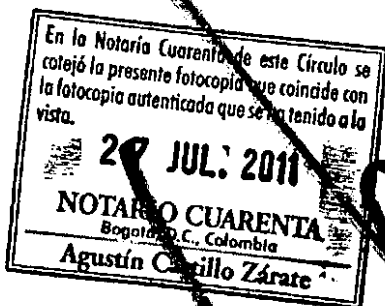
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by M. Tarver

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U.S. Patent and Trademark Office

Certified

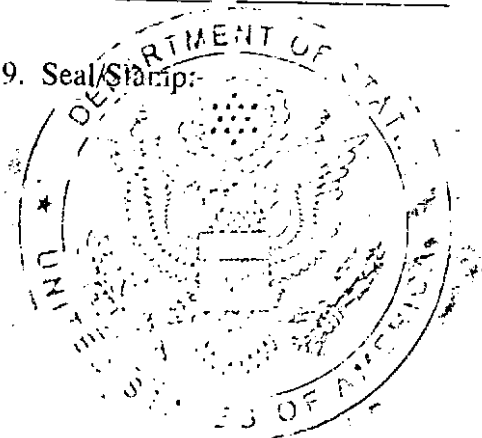
5. at Washington, D.C.

6. the eleventh of August, 2011

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 11045396-9

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Patrick O. Hatchett", is written over a horizontal line.

Patrick O. Hatchett

A 7308043



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

July 29, 2011

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
MARCH 12, 2010.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office

M. TARVER
Certifying Officer



PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT										
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT										
CONVEYING PARTY DATA											
<table border="1"><thead><tr><th>Name</th><th>Execution Date</th></tr></thead><tbody><tr><td>Gregory D Plowman</td><td>02/08/2010</td></tr><tr><td>Weilan Ye</td><td>02/08/2010</td></tr><tr><td>Yan Wu</td><td>03/05/2010</td></tr><tr><td>Wei-Ching Liang</td><td>03/05/2010</td></tr></tbody></table>	Name	Execution Date	Gregory D Plowman	02/08/2010	Weilan Ye	02/08/2010	Yan Wu	03/05/2010	Wei-Ching Liang	03/05/2010	
Name	Execution Date										
Gregory D Plowman	02/08/2010										
Weilan Ye	02/08/2010										
Yan Wu	03/05/2010										
Wei-Ching Liang	03/05/2010										
RECEIVING PARTY DATA											
Name:	GENENTECH, INC.										
Street Address:	1 DNA Way										
City:	South San Francisco										
State/Country:	CALIFORNIA										
Postal Code:	94080-4990										
PROPERTY NUMBERS Total: 1											
<table border="1"><thead><tr><th>Property Type</th><th>Number</th></tr></thead><tbody><tr><td>Application Number:</td><td>61163241</td></tr></tbody></table>	Property Type	Number	Application Number:	61163241							
Property Type	Number										
Application Number:	61163241										
CORRESPONDENCE DATA											
Fax Number:	(650)952-9881										
<i>Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.</i>											
Phone:	(650) 225-1489										
Email:	tarah@gene.com										
Correspondent Name:	Craig G. Svoboda										
Address Line 1:	Genentech, Inc.										
Address Line 2:	1 DNA Way										
Address Line 4:	South San Francisco, CALIFORNIA 94080										
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	PR4170-2										
NAME OF SUBMITTER:	Craig G. Svoboda										
Total Attachments: 2											

501118182

PATENT
REEL: 024075 FRAME: 0271

CH \$40.00 61163241

source=PR4170-2 Assignment#page1.tif
source=PR4170-2 Assignment#page2.tif

PATENT
REEL: 024075 FRAME: 0272

ASSIGNMENT

WHEREAS, Gregory D. Plowman, a citizen of the U.S., residing at 1386 Chesnut Street, San Carlos, California 94070; Weilan Ye, a citizen of the U.S., residing at 119 Barkentine Street, Foster City, California 94404; Yan Wu, a citizen of the U.S., residing at 1160 Blythe Street, Foster City, California 94404; and Wei-Ching Liang, a citizen of the Taiwan, residing at 840 Sea Spray Lane, #112, Foster City, California 94404 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

NOVEL ANTI- α 5 β 1 ANTIBODIES AND USES THEREOF

for which a provisional application Serial No. 61/163,241 (Docket No. PR4170-2) has been filed by them on March 25, 2009; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

PATENT
REEL: 024075 FRAME: 0273

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

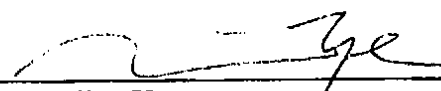
Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

2/8/10
Date


Name: Gregory D. Plowman

2/8/10
Date


Name: Weilan Ye

3/5/10
Date


Name: Yan Wu

3/5/10
Date


Name: Wei-Ching Liang

RECORDED: 03/12/2010

PATENT
REEL: 024075 FRAME: 0274

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A
GENENTECH, INC firmado por los cedentes y el cesionario.

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por M. TARVER
3. actuando en capacidad de FUNCIONARIO QUE CERTIFICA
4. lleva el sello/timbre de la OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE
LOS ESTADOS UNIDOS

Certificado

5. en Washington, D.C.
6. el once de agosto de 2011
7. por el Funcionario de Autenticación Asistente, Departamento de
Estado de los Estados Unidos.
8. No. 11045396-9
9. Sello/timbre

10. Firma

(Firma)

Patrick O. Hatchett

[Sello]

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODO AQUEL QUE PUEDA LLEGAR LA PRESENTE:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE ESTADOS UNIDOS
Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

13 de abril de 2011

LA PRESENTE CERTIFICA QUE EL ANEXO ES UNA COPIA VERDADERA
TOMADA DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO
ARCHIVADO EL 12 DE MARZO DE 2010.

Por la autoridad del
Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual
y Director de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

(Firma)

M. TARVER

Funcionario que certifica

Hay un sello que dice:
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos
Departamento de Comercio

CESIÓN DE PATENTE

Versión electrónica v1.1

Versión de la hoja v1.1

TIPO DE PRESENTACIÓN:	CESIÓN NUEVA
NATURALEZA DEL ACUERDO:	CESIÓN

DATOS DE LA PARTE CEDENTE

Nombre	Fecha de ejecución
Gregory D. Plowman	02/08/2010
Weilan Ye	02/08/2010
Yan Wu	03/05/2010
Wei-Ching Liang	03/05/2010

DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE

Nombre:	Genentech, Inc.
Dirección:	1 DNA Way
Ciudad:	South San Francisco
Estado/Pais:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080-4990

NÚMERO DE PROPIEDADES Total: 1

Tipo de Propiedad	Número
Número de solicitud:	61163241

DATOS DE CORRESPONDENCIA

Número de Fax: (650) 952 9881

La correspondencia será enviada por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.

Teléfono: 650 225 1489
 Correo electrónico: tarah@gene.com
 Nombre del destinatario: Craig G. Svoboda
 Dirección Línea 1: Genentech, Inc.
 Dirección Línea 2: 1 DNA Way
 Dirección Línea 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

NÚMERO DE EXPEDIENTE DE ABOGADO:	PR4170-2
NOMBRE DEL REMITENTE:	Craig G. Svoboda

Total anexos: 2

501118182

PATENTE

ROLLO: 024075 CUADRO: 0271

Anexos totales: 5

Fuente=PR4170-2 Assignment#page1.tif

Fuente=PR4170-2 Assignment#page2.tif

PATENTE

ROLLO: 024075 CUADRO: 0272

Expediente de Abogado No. PR4170-2

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Gregory D. Plowman**, un ciudadano de los E.U.A., residente en 1386 Chesnut Street, San Carlos, California 94070; **Weilan Ye**, un ciudadano de los E.U.A., residente en 119 Barkentine Street, Foster City, California 94404; **Yan Wu**, un ciudadano de los E.U.A., residente en 1160 Blythe Street, Foster City, California 94404; y **Wei-Ching Liang**, un ciudadano de Taiwan, residente en 840 Sea Spray Lane, #112, Foster City, California 94404 (en adelante denominados como "CEDENTES"), han inventado una invención nueva y útil

NUEVOS ANTICUERPOS Anti- $\alpha\beta 1$ Y SUS USOS

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serial No. 61/163,241 (Expediente No. PR4170-2) el 25 de marzo de 2009; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

PATENTE

ROLLO: 024075 CUADRO: 0273

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

02/08/10
Fecha

(firma)
Nombre: GREGORY D. PLOWMAN

02/08/10
Fecha

(firma)
Nombre: WEILAN YE

30/05/10
Fecha

(firma)
Nombre: YAN WU

03/05/10
Fecha

(firma)
Nombre: WEI-CHING LIANG

ARCHIVADO: 03/12/2010

PATENTE
ROLLO: 024075 CUADRO: 0274



No. 11-112591- -00000-0000

Fecha: 2011-09-01 16:04:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 196

PATENTE DE INVENCION ☐

MODEL

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐